

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS
Departamento de Física Aplicada III**



**APLICACIÓN DE LA DIELECTROFORESIS A LA
CARACTERIZACIÓN DIELECTRICA DE CÉLULAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Aránzazu Sanchis Otero

Bajo la dirección del doctor
Miguel Sancho Ruiz

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-0106-0**

©Aránzazu Sanchis Otero, 2008

TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LA
DIELECTROFORESIS
A LA CARACTERIZACIÓN
DIELÉCTRICA DE CÉLULAS

ARÁNZAZU SANCHIS OTERO
2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS



Tesis Doctoral

APLICACIÓN DE LA DIELECTROFORESIS A LA CARACTERIZACIÓN DIELÉCTRICA DE CÉLULAS

Aránzazu Sanchis Otero
Mayo 2008

Director
Dr. Miguel Sancho Ruiz

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por el Proyecto
CRAFT QLK2-CT-2001-70561 dentro del Programa Marco
de la Comunidad Europea

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, Miguel Sancho Ruiz, por la oportunidad brindada para iniciar mi labor investigadora, por su dirección y transmisión de conocimientos, siempre marcadas por su característica humildad. Cómo no, a Genoveva Martínez López, por su estrecha colaboración y su imprescindible apoyo a lo largo de este tiempo, acompañados en todo momento por su ánimo y buen humor que tantas veces han mitigado la tarea. A Carla Martín Villalba, por el trabajo que realizó sobre microelectrodos en la primera etapa de este estudio. Asimismo, a los profesores, compañeros y personal del Departamento de Física Aplicada III, no sólo por la posibilidad de trabajar juntos y el apoyo técnico recibido, sino también por su disponibilidad, su simpatía y su afecto. A todos los que me han llevado a conocer mano a mano algunas de las múltiples singularidades del campo de la Biología, tanto en mi paso por York como en mi estancia en Bucarest, y sin olvidar la colaboración recibida por parte de Víctor Jiménez Cid desde el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia. A mis padres y a mis hermanos, porque a pesar de todo han estado ahí, sosteniéndome y haciendo posible esta realidad. A todos aquellos con los que durante esta larga travesía he podido compartir los buenos y los malos momentos, el entusiasmo y las decepciones. A aquellos que me han ayudado con sus destrezas y conocimientos, o me han alentado con sus consejos, su amistad y sus oraciones. Y en definitiva, a todos aquellos que, más que esperar, han querido acompañarme.

Mil gracias.

*“La ciencia tiene raíces en lo
inmanente pero lleva al hombre a
lo trascendente”*

Juan Pablo II

*“Todo fue creado por él y para él;
él existe con anterioridad a todo,
y todo tiene en él su consistencia”*

Col 1, 16-17

CONTENIDOS

Goals and outline of the thesis	1
Publicaciones	5
Capítulo 1 <i>Introducción a las técnicas de caracterización dieléctrica</i>	9
1.1. Antecedentes	10
1.2. Propiedades dieléctrica de los materiales biológicos	13
1.2.1. Propiedades eléctricas de las células	15
1.3. Técnicas de caracterización celular	16
1.4. Caracterización dieléctrica y técnicas electrocinéticas AC	18
1.4.1. Dinámica de partículas en fenómenos electrocinéticos AC	21
1.4.2. Dielectroforesis	29
1.4.3. Electrorotación	31
1.4.4. Otros fenómenos electrocinéticas	32
1.5. Bibliografía	35
Capítulo 2 <i>Estudio y diseño numérico de microelectrodos para aplicaciones electrocinéticas</i>	43
2.1. Introducción	44
2.2. Método numérico	46
2.2.1. Electrodo de bandas paralelas	46
2.2.2. Electrodo dentado	49
2.3. Resultados y discusión	50
2.3.1. Electrodo de bandas paralelas	50
2.3.2. Electrodo dentado: almenados y diente sierra	51
2.3.3. Recubrimiento de electrodos	53

	2.4. Conclusiones	55
	2.5. Bibliografía	56
Capítulo 3	<i>Modelización dieléctrica de células biológicas</i>	59
	3.1. Introducción	60
	3.2. Métodos analíticos	61
	3.2.1. Modelos esféricos multicapa	61
	3.2.2. Modelo elipsoidal	62
	3.3. Métodos numéricos	64
	3.3.1. Método de los elementos de contorno	65
	3.4. Variación de parámetros. Sensibilidad de caracterización	69
	3.5. Conclusiones	72
	3.6. Bibliografía	73
Capítulo 4	<i>Caracterización dieléctrica de bacterias</i>	75
	4.1. Antecedentes y objetivos	76
	4.1.1. Diferenciación gram-positiva y gram-negativa	79
	4.1.2. Evaluación DEP de la acción bactericida de los antibióticos	80
	4.2. Procedimiento experimental	81
	4.2.1. Las muestras bacterianas	81
	4.2.2. La cámara de microelectrodos	82
	4.2.3. El sistema dielectroforético	83
	4.2.4. La toma de datos	84
	4.3. Análisis teórico	85
	4.3.1. Análisis de la colección de células	85
	4.3.2. Modelo dieléctrico de la bacteria	86
	4.4. Resultados y discusión	88
	4.4.1. Diferenciación DEP gram-positiva y gram-negativa	88
	4.4.2. Detección DEP de la acción antibiótica	91
	4.5. Conclusiones	96
	4.6. Bibliografía	98
Capítulo 5	<i>Efectos de interacción entre células</i>	101
	5.1. Introducción	102
	5.2. Metodología	104
	5.3. Efectos de forma y polidispersión	106
	5.4. Agregación de eritrocitos bajo campo EM de RF	109

5.4.1. Modelo de la respuesta eléctrica	110
5.5. Caracterización de linfocitos-T y formación de cadenas	115
5.5.1. Detección DEP de la acción antibiótica	117
5.5.2. Diferenciación DEP gram-positiva y gram-negativa	118
5.5.3. Detección DEP de la acción antibiótica	118
5.6. Conclusiones	123
5.7. Bibliografía	125
Capítulo 6 <i>Superficies celulares rugosas y campos EM</i>	127
6.1. Introducción	128
6.2. Metodología	129
6.2.1. Método BEM para el potencial cuasi-estático	130
6.2.2. Método BEM para la densidad de carga en las interfases	130
6.2.3. Método FEM para el potencial inducido en una geometría 3D	131
6.3. Resultados y discusión	131
6.3.1. Modelo sinusoidal de la rugosidad celular	132
6.3.2. Modelo fractal de la rugosidad celular	134
6.3.3. Modelos tridimensionales	135
6.3.4. Aplicación del modelo fractal para el análisis de la interacción entre células	137
6.4. Conclusiones	139
6.5. Bibliografía	141
Conclusions and contributions	143

GOALS AND OUTLINE OF THE THESIS

Since last decades of the XXth century, dielectrophoresis has been one of the most useful methods for manipulating microparticles in a wide variety of technological domains in which electrical processing of particles are involved. The motion of a dielectric particle caused by an external applied electric field, i.e, the dielectrophoretic phenomenon, has been used to separate, remove, handle and characterise different kinds of particles in a mixed suspension. Their different behaviours are the result of their different electrical and geometrical properties. The introduction of microelectrode technology has notably improved the dielectrophoretic devices, and therefore the interest of this procedure has risen in a variety of fields such as mineralogy, agriculture, environment and biomedical sciences. This fact has promoted the increase of possible applications, reducing collateral problems present in earlier dielectrophoretic experiments.

However, in order to profit from the potential of dielectrophoresis, an understanding of the electromechanic aspects, the microelectrode design and the analysis of electrical behaviour of particles, is of primary importance.

We have studied the dielectrophoretic force as a tool for characterising biological particles through the observation of several related parameters: the polarizability of the particle, the variations of the crossover frequency –at which the particle seems to be invisible to the applied field–, the transmembrane induced voltage and the electric energy. For this purpose, the behaviour of the particles subjected to an external electric field has been analysed through numerical computation, taking into account the imposed field effects as well as mutual particle interactions. The use of models closer to the real geometry of the particle, not provided by previous analytical models, leads to an accurate knowledge of the electrical behaviour of the particle, and hence to a better approximation to the physiological state of the cell. This state has been proved to be directly related to its electrical properties. It must be also mentioned that in this study we include the effect of the surface morphology on the dielectrophoretic response of the cell. As far as we know, no preceding works on the subject have considered this effect. In this way, this thesis is structured as follows:

- In the first chapter, we present the state of the art of the dielectrophoresis as a characterisation technique of biological cells, accompanied by a brief historical introduction and a comparison to another important characterisation technique, the dielectric spectroscopy. Analysis of several effects arising in the dielectrophoretic experiments –like electrode polarisation, electrothermal and electroosmotic effects or the ionic double layer influence– is made, as well as a mention to related electromechanical phenomena as electrorotation, travelling wave dielectrophoresis, and dielectrophoretic field flow fractionation.

- The second chapter contains the numerical method that has been developed and adjusted to optimize the design of the electrode configuration according to its dielectrophoretic application. It represents a contribution to the development of suitable numerical tools for the design of the new microelectromechanical systems (MEMS) used for selective trapping, manipulation and separation in biomedicine. In this sense, this study analyses different electrode shapes and considers the influence of several factors not included in previous works –as chamber dimensions, electrode thickness effect or dielectric coating of the electrodes–. The electrode production can be enormously improved by the determination of the electric field distribution, making possible to optimize and to reduce significantly the cost and time of the production task.

- The third chapter introduces the numerical method especially adapted for modelling the dielectric particles. We describe the boundary element method and analyse the sensitivity of the model to the variation of dielectric parameters.

- The fourth chapter presents the first application of our numerical method combined with the dielectrophoretic experiments made in collaboration with Cell Analysis Ltd. (York, UK). An automatized system provides the dielectrophoretic spectra of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. The numerical computation of the polarizability of these two different types of bacteria modelled with realistic geometries, and therefore overcoming the limitations of previous analytical models, is shown as an important tool to interpret the experimental dielectrophoretic spectra. Since the dielectrophoretic response of a bacteria is related to its own structure and physiological state, we propose this method as a complement to classical methods for differentiating between gram-positive and gram-negative bacteria, helping to avoid fails in their prediction and consequently, in the choice of an appropriate first medical treatment. Similarly, antibiotic exposition of bacteria implies changes in their dielectrophoretic responses –corresponding to internal structural and biological modifications– and hence, in their dielectric properties. In this way, the detection of antibiotic action over bacteria by means of the analysis of the dielectrophoretic spectra is possible, allowing the extraction of useful information for the required treatment to fight illness. This would aid to prevent the widespread problem of antibiotic resistances.

- The fifth chapter analyses the influences of the aggregation effects into “pearl-chains” originated by the applied electric field, often accompanying the dielectrophoretic experiments. The theoretical treatment of this situation has been usually focused as dipole-dipole interactions, neglecting other

multipolar effects and therefore underestimating the forces between particles when they come closer. Even though some research has been made to study interacting influences of neighbouring cells, the basis of our numerical method makes this problem affordable in a simpler way than other treatments. It gives very accurate results even when different sizes of approaching particles are taken into account. This first theoretical study of the interparticle interaction may be also useful to deal with colloidal particles, providing important information related to polydispersitivity effects in electrorheological fluids.

Focusing on the biomedical frame, a theoretical analysis of chaining formation of erythrocytes and lymphocytes has been made. First, we intend to identify possible influences of a radiofrequency field on the typical and known rouleau formation of red blood cells, on the basis of the decrease of the energy when cells are immersed in the electric field. Second, we analyse the shift of the crossover frequency when T-cells form progressively longer chains. Theoretical studies are compared with experimental results related to T-lymphocytes pearl-chaining in dielectrophoretic experiments performed by Dr Pethig and collaborators at the University of Bangor (UK). The aim of this research is the detection of possible activation effects in the immunological cells by means of the dielectrophoretic characteristic crossover frequency, directly related to the electric properties of the cell membrane.

- The sixth chapter includes an analysis of the surface morphology of the cell not considered in previous works on the subject. Taking into account two surface models for the cells –sinusoidal profile and fractal geometry– we apply the boundary element and the finite element methods –for 2D and 3D models respectively– for getting further insight into the influence of the surface morphology on relevant electrical parameters –like polarizability and transmembrane induced potential–. The study has also been used for interpreting the observed influence of chaining on the dielectrophoretic spectra when cells have a complex surface. Finally, the rough surface model is applied to study echinocyte cells –a pathological shape of erythrocytes with prominent protrusions over the surface– for analysing their electrical behaviour.

PUBLICACIONES

ARTÍCULOS Y PROCEEDINGS

- ***'Application of a BEM technique to the computation of dielectrophoretic forces on cells'***
A. Sanchis, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz.
Advances in Boundary Element Techniques IV, p. 421-426. Eds. R. Gallego y M.H. Aliabadi,
Queen Mary University of London, 2003
ISBN: 0904 188965
- ***'Interparticle forces in electrorheological fluids: effects of polydispersity and shape'***, *Colloids and Surfaces A* 249 (2004) 119-122.
A. Sanchis, A.P. Brown, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz, J.M. Miranda.
- ***'A BEM modelling of the dielectrophoretic behaviour of bacterial cells'***
A. Sanchis, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz.
2004 URSI EMTS, International Symposium on Electromagnetic Theory, p. 1218. Edizione
PLUS - *Università di Pisa*, 2004
ISBN: 88-8492-252-6
- ***'Dielectrophoresis and theoretical studies of dipolar chaining effects in cells'***
A. Sanchis, M. Sancho, R. Pethig.
IEEE Conference Proceedings. 27th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2005.
ISBN: 0-7803-8740-6
- ***'Numerical design of microelectrodes for cell electrokinetics applications'***
A. Sanchis, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz.
Proceedings of Joint 9th International Conference on Electromagnetics in Advanced Applications ICEAA' 05 and 11th European Electromagnetic Structures Conference EESC' 05, p. 205.
ISBN: 88-8202-094-0

- **'Modelling surface roughness effects in the interaction of EM fields with biological cells'**
A. Sanchis, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz.
Proceedings of 4th International Workshop on Biological Effects of EMFs, p.1164. Ed. Kostarakis, 2006.
ISBN 960-233-172-0
- **'Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis'**, *Bioelectromagnetics* 28 (2007) 393-401.
A. Sanchis, A.P. Brown, M. Sancho, G. Martínez, J.L. Sebastián, S. Muñoz, J.M. Miranda.
- **'Numerical analysis of microelectrodes for cell electrokinetics applications'**.
Enviado al *Journal of Applied Physics*
G. Martínez, A. Sanchis, M. Sancho.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Comunicación oral en:
'Fourth International Conference on Boundary Element Techniques'.
Granada, Julio 2003.
'Application of a BEM technique to the computation of dielectrophoretic forces on cells'.
- Póster en:
'APHYS2003, First International Meeting on Applied Physics'.
Badajoz. Octubre 2003.
'Interparticle forces in electrorheological fluids: effects of polydispersity and shape'.
- Comunicación oral en:
'2004 International Symposium on Electromagnetic Theory - URSI, International Union of Radio Science'.
Pisa, Italia. Mayo 2004.
'A BEM modelling of the dielectrophoretic behaviour of bacterial cells'
- Póster en:
'BES-ISE 2005: XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics'
Coimbra, Portugal. Junio 2005.
'Influence of radio frequency fields on red cell aggregation'
- Póster en:
'BioEM 2005-Bioelectromagnetics'
Dublín, Irlanda. Junio 2005.
'Dielectric characterization of bacterial cells using Dielectrophoresis'
- Comunicación oral en:
'2005 International Conference on Electromagnetics in Advanced Applications and European Electromagnetic Structures Conference'
Turín, Italia. Septiembre 2005.
'Numerical design of microelectrodes for cell electrokinetics applications'

- Póster en:
'Fourth International Workshop on Biological Effects of Electromagnetics Fields'
Creta, Grecia. Octubre 2006.
'Modelling surface roughness in the interaction of EM fields with biological cells'

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DIELECTRICA CELULAR

Toda partícula como consecuencia de sus propiedades eléctricas o magnéticas experimenta fuerzas y torques al encontrarse bajo la acción de campos electromagnéticos. Cuando tales partículas son células biológicas, su comportamiento ante el campo electromagnético puede revelar valiosa información sobre su estructura, morfología y fisiología. En este capítulo se presenta una pequeña referencia a la evolución en el estudio de las propiedades eléctricas de las células, así como de las técnicas empleadas a tal efecto: desde los primeros indicios de interacción entre el campo eléctrico y la materia orgánica hasta el establecimiento de la espectroscopía de impedancia y las técnicas electrocinéticas como métodos de caracterización celular, pasando desde el empleo de electrodos manufacturados hasta el de dispositivos de microfabricación.

1.1. ANTECEDENTES

Extraer información de los sistemas biológicos en base a su respuesta a un estímulo eléctrico externo es el objetivo de los diversos métodos de caracterización de tejidos y células biológicas desde hace casi una centuria. Ya a principios del pasado siglo, entre los años 1910 y 1913, el médico alemán Höber, muy interesado en la fisiología de la membrana celular, llevó a cabo experimentos dieléctricos con eritrocitos con el fin de estudiar sus propiedades eléctricas (Höber 1912). Pudo observar que a una frecuencia de 1kHz una suspensión de eritrocitos presentaba una resistividad de $1200 \Omega \text{ m}$, y que aumentando la frecuencia a 10 MHz, la resistividad disminuía hasta $200 \Omega \text{ m}$. Advirtió también que la resistividad que presentaban células hemolizadas –rotas– a bajas frecuencias era muy similar a la medida a altas frecuencias en las células íntegras. Llegó así a la conclusión de que en altas frecuencias no hay diferencia entre células íntegras y células destruidas, dado que en el primer caso se mide la resistividad de la solución interna y en el segundo la de la solución externa, siendo ambas electrolitos concentrados. De este modo se empezó a considerar que, eléctricamente, las células estaban caracterizadas por un citoplasma de baja resistividad, rodeado por una membrana muy poco conductora. Asimismo, se introdujeron los conceptos de capacidad específica de la membrana y la variación de su impedancia con la frecuencia de la señal eléctrica.

A partir de ahí, posteriores investigaciones corroboraron los resultados obtenidos por Höber. En 1921 Phillipson, basándose en las medidas que llevó a cabo con eritrocitos, músculo esquelético e hígado, estableció el circuito eléctrico equivalente para biomembranas: interpretó los resultados con el circuito de resistencia y capacidad en paralelo –representando la membrana– a la que añadió una resistencia en serie –el citoplasma– (Phillipson 1921). En 1922, Osterhout medía la conductividad de la membrana del alga marina *Laminaria* a 1 kHz y atribuyó su bajo valor cuando estaba viva a la escasa permeabilidad iónica de la membrana, ya que después de muerta tenían la misma conductividad que el agua de mar (Osterhout 1922). En 1925, Rogers y Cole confirman las propiedades capacitivas de la membrana observadas por Höber en los eritrocitos, pero estudiando ahora los huevecillos del erizo de mar *Arbacia punctulata* (Rogers y Cole 1925). Se iban definiendo entonces con claridad como características eléctricas de la célula viva su interior conductor –compuesto por una solución iónica– y la capa relativamente impermeable y mala conductora que rodea a dicho electrolito. Posteriormente, las numerosas investigaciones en el campo de las propiedades dieléctricas de las células biológicas y en su interpretación mediante modelos de capas, comenzaban a asentar las bases de la técnica conocida como espectroscopía dieléctrica o de impedancia. Fricke desarrolló el modelo para una célula esférica rodeada por una fina capa de baja conductividad (Fricke 1925), que posteriormente amplió para incluir el modelo multi-capas (Fricke 1953) y geometrías elipsoidales (Fricke 1955). Cole, con su trabajo durante la década de 1920 hasta la de 1940, hizo una gran contribución a la medida e interpretación del espectro dieléctrico en general, así como al de las suspensiones celulares y de tejidos (Cole y Cole 1941; Cole 1972). Schwan, entre otros, aportaba los conocimientos extraídos de su indagación sobre

los fenómenos dispersivos de los materiales biológicos en base a las teorías de Maxwell y Wagner (Bothwell y Schwan 1956; Schwan 1957).

Pero a mediados del pasado siglo, paralelamente al desarrollo de la espectroscopía de impedancia, hay una vuelta al estudio de la interacción de la materia con campos eléctricos no uniformes. Los efectos provocados por la no uniformidad del campo estaban ya presentes en las observaciones recogidas por el filósofo Tales de Mileto cerca del año 600 a.C., en lo que se considera el descubrimiento de la electricidad. El trozo de ámbar que después de haber sido frotado con un paño atraía pequeñas partículas de otros materiales, lo hacía porque había sido cargado y a su alrededor había un campo no uniforme. Muchos siglos después, en el año 1600, fue nuevamente señalado un fenómeno similar por el médico Gilbert en su tratado sobre el magnetismo "*De magnete, magneticisque corporibus*", tras observar el cambio de forma de las gotas de agua cerca de ámbar electrificado. Sobre la atracción que ejercían los campos eléctricos en la materia orgánica tal vez se pensó que poco más había que añadir después del desarrollo teórico que Maxwell llevó a cabo sobre los efectos electromagnéticos en el siglo XIX. Sin embargo, fue en 1951 cuando el científico Pohl acuñaba el término de dielectroforesis para denominar dichos fenómenos, recogiendo en aquél la descripción del fenómeno observado en el que partículas dieléctricas (*dielectro*) respondían con un movimiento (*phoresis*, en griego) a la acción de un campo eléctrico no uniforme (Pohl 1951). La dielectroforesis no ha de confundirse con otro fenómeno más conocido, la electroforesis, en el que una partícula con carga neta responde con un movimiento a un campo eléctrico externo.

Las principales aplicaciones del movimiento de partículas bajo los efectos de la no uniformidad del campo estuvieron en principio orientadas a su manipulación y separación, en base a sus distintas propiedades dieléctricas. En 1966 se realizó la primera separación de levaduras viables y no-viables (Pohl y Hawk 1966). Estos experimentos se hicieron extensivos para separar otras células, como trombocitos de origen canino, bacterias, glóbulos rojos, cloroplastos y mitocondrias (Pohl 1978). En 1971 se profundizó en el estudio del comportamiento DEP de las levaduras en función de determinados factores biológicos controlados, como la edad del cultivo, efectos térmicos o de radiación UV o la exposición a agentes químicos (Pohl y Crane 1971). La separación y manipulación de partículas mediante dielectroforesis se fundamentaba en la dependencia del fenómeno con la diferencia entre las propiedades dieléctricas de las partículas y las del medio en que están suspendidas, así como de la magnitud y la frecuencia del campo aplicado. Así, mientras se iba perfilando el empleo de la dielectroforesis para la caracterización dieléctrica de partículas, fue en el campo de la fusión celular, en 1982, donde la manipulación dielectroforética dio uno de los más espectaculares resultados: la electrofusión de dos tipos celulares aplicando un potente pulso DC, que perforó las membranas en el punto de contacto entre las células previamente colectadas mediante DEP sobre la superficie de los electrodos (Zimmermann y Vienken 1982). Pero la base de las anteriores aplicaciones dielectroforéticas se apoyaba en los diversos modelos multicapa con geometrías esféricas, elipsoidales y cilíndricas desarrollados también para la interpretación de los parámetros dieléctricos en la espectroscopía de impedancia

(Irimajiri *et al.* 1979; Asami *et al.* 1989; Gimsa y Wachner 1999). Estos hechos llevaron, en la última década del pasado siglo XX, al empleo de la dielectroforesis como instrumento de caracterización dieléctrica (Gascoyne *et al.* 1992; Huang *et al.* 1992; Gascoyne *et al.* 1993; Beving *et al.* 1994; Markx *et al.* 1994; Wang *et al.* 1994; Gascoyne *et al.* 1995).

Desde los inicios de la dielectroforesis hasta el día de hoy, la evolución de los electrodos que generan el campo eléctrico no uniforme, ha pasado desde láminas, alambres, bastones o puntas metálicas en sus más diversas configuraciones y combinaciones – punta-placa (Pohl y Hawk 1966), punta-punta (Pohl y Crane 1971; Iglesias *et al.* 1984), bastón-placa (Kaler *et al.* 1995), alambres paralelos-placa, alambres paralelos y de cuatro polos (Gimsa *et al.* 1991)– hasta llegar a incorporar la tecnología de microfabricación para diversas configuraciones de electrodos (Price *et al.* 1988; Washizu 1990; Washizu *et al.* 1990; Fuhr *et al.* 1992; Wang *et al.* 1993a; Markx *et al.* 1994). Con este último avance, todas las aplicaciones dielectroforéticas se han visto enormemente beneficiadas, ya que la microtecnología ha permitido desarrollar electrodos que optimizan el proceso, generando fuerzas DEP suficientemente intensas para mover partículas empleando pequeños voltajes. Así, se ha conseguido la manipulación DEP de partículas hasta del orden de décimas de nanómetros– como virus, proteínas y moléculas de ADN– evitando la fuerte influencia los procesos aleatorios térmicos en determinadas condiciones (Green *et al.* 1997a; Asbury y van den Engh 1998; Hughes *et al.* 1998; Yamamoto *et al.* 2000; Hughes *et al.* 2001; Germishuizen *et al.* 2003; Nedelcu y Watson 2004; Zheng *et al.* 2004; Chang y Petit 2005; Nishikawa *et al.* 2005; Tuukkanen *et al.* 2005; Kang *et al.* 2006). Además, ha favorecido la actual tendencia a crear dispositivos integrados de tamaño micrométrico para el análisis y la manipulación de biopartículas, en lo que se conoce como “laboratorio en un chip”.

Como reseña en este desarrollo, cabe destacar que la combinación de la dielectroforesis con la espectroscopía de impedancia ha dado lugar una técnica denominada medida de impedancia dielectroforética (DEPIM). En este caso, la técnica está orientada principalmente a la detección selectiva de partículas, en base a la impedancia medida entre los electrodos donde las células son colectadas mediante dielectroforesis (Suehiro *et al.* 2003). De igual manera, varios trabajos presentan el método dielectroforético como alternativa a la citometría de flujo en el análisis de los cambios inducidos en diferentes biopartículas bajo la acción de diversos agentes químicos, como toxinas, drogas, antibióticos, etc. La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que, mediante la medida de la dispersión de luz y/o fluorescencia de las células, proporciona información sobre la estructura celular. Dielectroforesis y citometría de flujo se emplean para evaluar la resistencia multidroga reversible (MDR) de células tumorales (Labeed *et al.* 2003), o son comparados en su eficacia como métodos para detectar la respuesta de células leucémicas a varios antibióticos (Ratanachoo *et al.* 2002). Finalmente, la reciente combinación de la dielectroforesis con pinzas ópticas (*optical tweezers*), ha posibilitado la calibración de la fuerza óptica con la que el haz láser –que convenientemente focalizado, es capaz de confinar partículas microscópicas de forma controlada– atrapa partículas en suspensión (Papagiakoumou *et al.* 2006). Un paso más allá de este resultado, que llevaría a la profundización en el conocimiento estructural de la célula, sería poder medir la fluidez de la

membrana en una célula que, atrapada por la pinza óptica, sufre una deformación reversible al verse sometida a su vez por una fuerza DEP que la empuja hacia la superficie de los electrodos.

Aunque el presente estudio se centra en el ámbito de la biología, hay que señalar que el uso de campos eléctricos no uniformes es importante también en otros ámbitos científicos e industriales donde tiene lugar la manipulación de micropartículas, tales como en mineralogía, xerografía, electrónica, industria farmacéutica, medio ambiente, tecnología de los alimentos, etc.

1.2. PROPIEDADES DIELECTRICAS DE LOS MATERIALES BIOLÓGICOS

Antes de abordar la caracterización de las células biológicas e indagar en el conocimiento que, a través de los parámetros eléctricos, podemos inferir del estado funcional de la célula, introduciremos una visión general sobre el comportamiento de la materia ante un campo eléctrico externo.

La respuesta de toda materia a un campo electromagnético viene descrita por las ecuaciones de Maxwell. Según éstas, dicha respuesta depende de los parámetros eléctricos pasivos de la materia: la conductividad eléctrica σ , la permitividad eléctrica ε , y la permeabilidad magnética μ . La mayor parte de la materia biológica tiene una permeabilidad magnética similar a la del vacío, μ_0 , por lo que el análisis de su respuesta dieléctrica se centra en la conductividad y en la permitividad relativa a la del vacío. Estos parámetros constitutivos de la materia proporcionan, por un lado, su capacidad para permitir el movimiento de los portadores de carga en su seno y, por otro, una medida de su polarizabilidad. Respecto a los materiales neutros, heterogéneos y dispersivos –características de la materia biológica– sus propiedades eléctricas, por propia definición, presentan una dependencia con la frecuencia del campo eléctrico. Un primer análisis del comportamiento de un material neutro bajo el campo puede llevarse a cabo mediante un espectro dieléctrico, a través del cual se mide su permitividad compleja en un rango determinado de frecuencias. La permitividad compleja engloba los parámetros constitutivos –permitividad y conductividad– por lo que un análisis del espectro junto con un correcto modelo de interpretación proporcionará valiosa información sobre la estructura y, en su caso, sobre las propiedades funcionales de la materia. La permitividad compleja $\tilde{\varepsilon}$ está definida como

$$\tilde{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon - i \frac{\sigma}{\omega} \quad (1.1)$$

donde ω es la frecuencia angular y $i = \sqrt{-1}$ la unidad imaginaria. Para la mayor parte de las sustancias, la permitividad y la conductividad son constantes solo en un rango determinado de la frecuencia. La tendencia general es una caída escalonada de la permitividad al tiempo que la conductividad aumenta al recorrer en sentido creciente las frecuencias del espectro.

Esta caída escalonada es característica de los fenómenos dispersivos que podemos considerar desde dos aproximaciones diferentes. En materiales biológicos, teniendo en cuenta su naturaleza física, hablamos de la dispersión de Maxwell-Wagner a nivel estructural, y de la dispersión de Debye a nivel molecular. O bien, atendiendo al rango de frecuencias en el que ocurren, los materiales biológicos se caracterizan por presentar tres dispersiones principales, conocidas por dispersiones α , β y γ , tal como muestra la Figura 1.1 para una suspensión celular (Schwan 1957). A bajas frecuencias –por debajo de algunos kHz– se presenta la dispersión α que recoge numerosos efectos relacionados con el procedimiento experimental de adquisición del espectro: relajaciones hidrodinámicas, corrientes inducidas de convección electro-osmóticas, electroforesis de la partícula o procesos de doble capa iónica y de polarización de los electrodos en la interfase electrodo-electrolito. Todos estos efectos son difícilmente separables, por lo que pueden introducir errores en la medida de las propiedades dieléctricas de las partículas en suspensión. En la dispersión β –en el rango de radiofrecuencias, desde algunos kHz hasta aproximadamente 100 MHz– se observan las dispersiones de origen estructural, principalmente por la polarización interfacial Maxwell-Wagner en la interfase membrana-electrolito, o debidas a la dependencia frecuencial de la orientación de dipolos moleculares, llamadas entonces dispersiones Debye. Por último, la dispersión γ –en el rango de microondas, por encima de 100 MHz– es debida a la asociación-disociación de grupos cargados de pequeñas moléculas así como a la dispersión de las moléculas de agua.

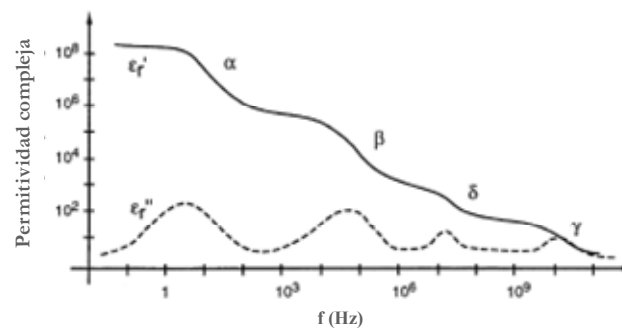


Figura 1.1. Espectro ideal de las propiedades dieléctricas de suspensiones celulares y tejidos, en términos de la parte real ϵ_r' – la permitividad relativa – y la parte imaginaria ϵ_r'' – pérdida dieléctrica – de la permitividad compleja relativa.

Los efectos dispersivos de las estructuras más finas dentro de las células exigen una mayor diferenciación del espectro, ya que en baja frecuencia, radiofrecuencia y microondas se observan múltiples comportamientos dispersivos. Es el caso de proteínas y otras macromoléculas que producen dispersiones a frecuencias que pueden encontrarse desde el rango α hasta el rango γ , dependiendo del tamaño y la carga de las moléculas. Por ejemplo, entre las dispersiones β y γ , tal y como aparece en la figura 1.1, se da la llamada dispersión δ , cuyo origen se encuentra en los procesos dispersivos de las moléculas de agua ligada a proteínas y en el movimiento de otras proteínas internas.

1.2.1. PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS CÉLULAS

Un paso necesario para una correcta interpretación de la respuesta dieléctrica de la materia biológica, es el conocimiento de las distintas estructuras celulares, que posteriormente incorporaremos a los modelos dieléctricos de las células. Por eso, se realiza un breve análisis de cada una de las estructuras implicadas en el comportamiento celular frente a un campo eléctrico.

A. La superficie celular

La superficie más externa es el límite entre la célula y su entorno, y su composición es más o menos compleja dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, algunas bacterias pueden llegar a presentar una capa de proteínas (conocida por capa S), fimbrias y pilis (ambos de naturaleza proteica), o una capa de glicocáliz (material polisacárido) que se extiende a lo largo de toda la célula.

Por tanto, siendo predominantes en la capa superficial de prácticamente todas las células los grupos de carga negativa –como carboxilos o fosfatos–, los iones positivos del medio son atraídos a la superficie creando una doble capa iónica. La formación de esta doble capa explica el alto valor de la permitividad observado en bajas frecuencias, y los efectos dispersivos que en ella se producen se encuentran en el rango de la dispersión α .

B. La pared celular

Esta envoltura es característica de las células vegetales y de algunos microorganismos, y es responsable de la rigidez de estas células. Presenta una diversificada y elaborada estructura que varía entre distintas células. La composición principal consiste en largas cadenas de polisacáridos, aminoácidos y otros polímeros. Los grupos cargados de la pared hacen que ésta actúe como intercambiador iónico, por lo que sus propiedades eléctricas cambiarán en función de la concentración iónica del medio circundante. Los trabajos de Carstensen (Carstensen y Marquis 1968) mostraron que la conductividad de la pared permanece relativamente constante cuando dicha concentración permanece baja, pero que aumenta rápidamente si la concentración iónica del medio excede a la propia de la pared.

C. La membrana

La membrana plasmática, componente principal de las células, consiste en una bicapa lipídica de entre 4 y 10 nm de espesor en la que se disponen diversas proteínas que, formando canales transmembrana, regulan el transporte de nutrientes entre el exterior y el interior celular. En condiciones normales, la membrana presenta baja permeabilidad iónica, por lo que es considerada como una capa de baja conductividad, permitiendo a la célula mantener una diferencia de potencial con el medio externo. Esta diferencia de potencial es lo que se conoce por potencial transmembrana (TMP), cuyo valor oscila entre 10 y 100 mV, y que mantiene el interior celular negativo respecto al exterior. El TMP juega un importante papel energético y de transporte en la actividad metabólica celular, y por tanto revela el buen estado fisiológico

de la célula. Mientras, el valor normal de la capacidad que presenta una membrana plasmática es de 10 mF/m², aunque la presencia de ramificaciones como pliegues, microvellosidades o bolsas, influye en la estimación de este valor y de su dependencia con la frecuencia del campo aplicado. De ello se deduce la importancia de incluir esta estructura de la forma más detallada posible en el modelo que apoye la caracterización dieléctrica de la célula. Dado el comportamiento y la estructura de la membrana, esta bicapa lipídica se ha comparado en múltiples ocasiones con el espacio entre las dos placas de un condensador. Asimismo, el efecto de dispersión β que aparece en el rango de radiofrecuencias se ha atribuido al fenómeno de relajación Maxwell-Wagner que se da en las interfases entre los medios conductores intra y extracelular, y la membrana aislante.

D. El citoplasma

El interior celular está compuesto por una solución electrolítica en la que podemos encontrar proteínas, moléculas de agua libres o ligadas a proteínas, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y en el caso de las células eucariotas, además orgánulos intracelulares –como el núcleo o vacuolas– que afectan también a las propiedades dieléctricas. El citoplasma puede considerarse como una solución salina altamente conductora con una gran concentración de material orgánico. Las dispersiones en el citoplasma sólo pueden ocurrir una vez que la barrera membranosa ha sido superada por el campo eléctrico, por lo que nos situamos en el rango de altas frecuencias. Especialmente significativas a frecuencias mayores de 20 MHz son las dispersiones provocadas por la rotación de las moléculas de agua, tanto las ligadas a proteínas, como las que no lo están.

1.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR

La caracterización de sistemas heterogéneos, entre los que se encuentran las células biológicas, requiere técnicas de medida que presenten bajo riesgo de desnaturalización de la partícula, o dicho de otro modo, de métodos no invasivos. El carácter no invasivo de una técnica en la cual la célula es sometida a la acción de un campo eléctrico, viene dado por el valor del potencial de membrana inducido por dicho campo. Para medidas dieléctricas con campos de intensidad $E_0 = 100$ V/m y frecuencia desde 1 Hz hasta 10 MHz, éste no supone más que un 0.05% del valor de potencial de membrana (Gheorghiu 1996). Como método no invasivo, el empleo de medidas dieléctricas para el estudio de parámetros moleculares y celulares es, a día de hoy, una técnica establecida, cuya importancia sigue vigente alentada por la necesidad de posibles mejoras, tanto en la técnica como en su interpretación (Pethig y Markx 1997).

En el origen de las técnicas de caracterización celular, se ha visto cómo la medida de la impedancia eléctrica ya fue empleada por Höber a principios del siglo XX en su estudio sobre la membrana de los eritrocitos. Desde entonces, la espectroscopía de impedancia eléctrica

(EIE), también conocida como espectroscopía dieléctrica, se ha venido aplicando reiterada y regularmente como método de caracterización. Sin embargo, los problemas implicados en la toma de medidas a través de dicha técnica, y el desarrollo de la microtecnología en los últimos años, ha facilitado que los fenómenos electrocinéticos –dielectroforesis (DEP) y electrorotación (ER)– supongan una potente alternativa para la caracterización celular. A pesar de que el conocimiento expreso de la dielectroforesis se produjo hace más de medio siglo, su empleo como herramienta analítica para la extracción de los parámetros eléctricos de los compartimentos de la célula biológica es reciente (Burt *et al.* 1990; Gimsa 2001; Holzel 2002; Hughes *et al.* 2002; Ratanachoo *et al.* 2002; Johari *et al.* 2003; Labeed *et al.* 2003; Broche *et al.* 2005; Labeed *et al.* 2005; Labeed *et al.* 2006). Durante años, y sobretudo en la década de los noventa, la principal aplicación del fenómeno dielectroforético había sido su empleo como herramienta para manipulación, separación, clasificación y concentración de biopartículas (Becker *et al.* 1995; Talary *et al.* 1996; Green *et al.* 1997b; Docoslis *et al.* 1999; Ikeda *et al.* 2003).

Más concretamente, la espectroscopía de impedancia consiste en la aplicación de una diferencia de potencial alterno entre los electrodos en contacto con la suspensión celular a investigar: tomando como referencia la corriente alterna que pasa a través de la muestra, se compara con el voltaje de salida. De este modo, resulta una medida directa de la impedancia que la suspensión celular ofrece al campo eléctrico y, barriendo un rango de frecuencias, nos permite obtener el espectro característico. Este espectro es caracterizado con la ayuda de un circuito equivalente cuyo comportamiento simule la respuesta de la suspensión celular al estímulo eléctrico modelo –Cole-Cole, Davidson y Cole, etc– y con modelos del comportamiento eléctrico de la suspensión –modelos de Maxwell, Bruggeman, Hanai, Looyenga, etc (Takashima 1989)–. Sin embargo, esta técnica de caracterización presenta algunos inconvenientes, tales como la polarización de los electrodos –consecuencia del contacto de soluciones electrolíticas con el metal del electrodo– que supone serios problemas de medida en frecuencias por debajo de los 10 kHz, o la elevada densidad de partículas –requerida para obtener una buena sensibilidad en la medida–, y que favorece la interacción entre ellas introduciendo efectos no lineales en la dependencia frecuencial de la respuesta al campo. Presenta también la limitación del estudio a unos valores relativamente bajos de la conductividad del medio, con lo que no es posible realizar experimentos en las condiciones fisiológicas normales de las células.

Por su parte, las técnicas electrocinéticas evitan en cierto grado algunos de estos inconvenientes. Están basadas en la interacción del momento dipolar inducido en la partícula con el campo eléctrico inductor. En un primer acercamiento a la terminología, diremos que la dielectroforesis, cuyo acrónimo DEP proviene del término inglés *dielectrophoresis*, es el movimiento traslacional que sufren partículas neutras en regiones de gradiente de campo, mientras que la electrorotación es el movimiento rotacional de las mismas en campos eléctricos rotativos. Ambos fenómenos pueden usarse de forma complementaria para extraer información de las partículas bajo estudio cuya estructura y parámetros dieléctricos son desconocidos (Wang *et al.* 1993b). Las ventajas que presentan los métodos electrocinéticos

frente a la espectroscopía de impedancia son, por un lado, una mayor precisión de los parámetros al poder caracterizar las partículas de forma individual, o con pequeños volúmenes de partículas en suspensión, evitando las interacciones entre las mismas; y por otro, un soporte tecnológico que posibilita limitar los fenómenos que interfieren con las medidas a bajas frecuencias –rango de dispersión α del espectro– como son las interacciones electrolito-electrodo, los fenómenos hidrodinámicos, las corrientes de convección, el movimiento aleatorio de las partículas submicroscópicas, etc.

En resumen, mientras que la impedancia dieléctrica es una medida directa de la respuesta al campo eléctrico de una suspensión celular, las técnicas electrocinéticas analizan la dependencia frecuencial de los movimientos de traslación y de rotación de las partículas bajo campos no uniformes o rotatorios, respectivamente. A su vez, aquella proporciona un promedio estadístico de datos del conjunto celular, mientras que éstas permiten el análisis de una única célula. Ahora bien, en cualquiera de los métodos, las respuestas de las partículas están basadas en los mismos principios de polarización interfacial Maxwell-Wagner, por lo que la información que puede obtenerse sobre las propiedades estructurales y eléctricas de los sistemas heterogéneos a nivel molecular y macroscópico a través de ellas es similar (Wang *et al.* 1993b; Gimsa y Wachner 1998). En la Figura 1.2 se presenta de forma esquemática las estructuras y propiedades dieléctricas de las células que responden en los distintos rangos de la frecuencia del campo aplicado, pudiendo ser investigadas por la espectroscopía dieléctrica y la dielectroforesis.

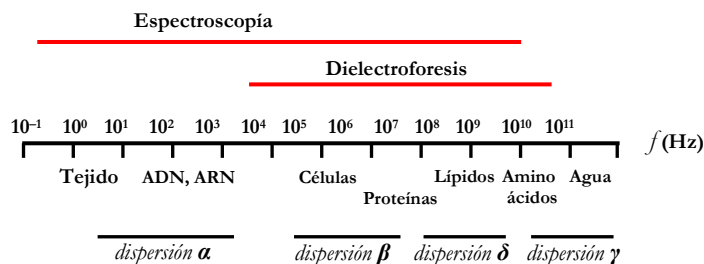


Figura 1.2. Rangos de frecuencias que abarcan las técnicas de caracterización dieléctrica, junto con los correspondientes a las dispersiones dieléctricas en biomateriales (Feldman *et al.* 1992).

1.4. CARACTERIZACIÓN DIELÉCTRICA Y TÉCNICAS ELECTROKINÉTICAS AC

Los fenómenos electrocinéticos se definen como los movimientos producidos por las fuerzas o torques que toda partícula sometida a un campo eléctrico experimenta como consecuencia de sus propiedades eléctricas. Dependiendo de la naturaleza del campo eléctrico aplicado, de las partículas y del medio en el que se encuentran suspendidas, se pueden inducir

diversos movimientos sobre aquéllas en función de la aplicación buscada. En el caso general de una partícula esférica homogénea e isotrópica de radio a , permitividad ε_p y conductividad σ_p , suspendida en un fluido de características ε_m y σ_m , y sometida a un campo eléctrico de frecuencia ω , $\tilde{\mathbf{E}} = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$, el promedio de la fuerza que actúa sobre la partícula resulta ser,

$$\langle \mathbf{F}(t) \rangle = 2\pi\varepsilon_m a^3 \left\{ \text{Re}(\tilde{f}_{\text{CM}}) \nabla E_{\text{rms}}^2 + \text{Im}(\tilde{f}_{\text{CM}}) \left[E_x^2 \nabla \varphi_x + E_y^2 \nabla \varphi_y + E_z^2 \nabla \varphi_z \right] \right\} \quad (1.2)$$

donde E_{rms} es el valor eficaz del campo eléctrico, de componentes (E_x, E_y, E_z) y fases $(\varphi_x, \varphi_y, \varphi_z)$; $\text{Re}(\tilde{f}_{\text{CM}})$ y $\text{Im}(\tilde{f}_{\text{CM}})$ son la parte real e imaginaria del llamado factor de Clausius-Mossotti, \tilde{f}_{CM} . En esta expresión para la fuerza se observan las distintas contribuciones independientes al movimiento de la partícula, que serán expuestas en sucesivos apartados: por un lado, la referida a la no uniformidad espacial de la magnitud del campo eléctrico, que origina la dielectroforesis (DEP), y por el otro, la no uniformidad de la fase, que da lugar bien al fenómeno de la electrorotación (ER), cuando el campo eléctrico aplicado es rotatorio, bien al fenómeno combinado de dielectroforesis y onda viajera (*tw*DEP). El factor complejo \tilde{f}_{CM} de la ecuación (1.2) está definido por

$$\tilde{f}_{\text{CM}}(\omega) = \frac{\tilde{\varepsilon}_p(\omega) - \tilde{\varepsilon}_m(\omega)}{\tilde{\varepsilon}_p(\omega) + 2\tilde{\varepsilon}_m(\omega)} \quad (1.3)$$

donde las permitividades complejas, $\tilde{\varepsilon}_p = \varepsilon_p - i(\sigma_p/\omega)$ y, análogamente, $\tilde{\varepsilon}_m$, recogen los dos aspectos de la respuesta eléctrica de la materia, conducción y polarización, en función de la frecuencia del campo eléctrico. Los diferentes valores de la permitividad a ambos lados de la interfase entre la partícula y el medio dan lugar a la llamada relajación interfacial de Maxwell-Wagner. Este fenómeno se origina como consecuencia de la respuesta no inmediata al campo eléctrico aplicado, y por tanto, el tiempo necesario para que la carga superficial se disponga en la interfase de los medios. Esta relajación explica el comportamiento dispersivo intrínseco de toda partícula homogénea en un medio fluido sometida a un campo eléctrico. Para el caso de partículas multicapa –como las células biológicas– ha de considerarse no sólo el fenómeno de relajación en la interfase partícula-medio externo, sino también en cada una de las superficies que separan dos medios en la partícula. Así, los procesos de polarización de cada una de las interfases quedarán reflejados en la expresión del factor de Clausius-Mossotti, que presentará, consecuentemente, mayor complejidad.

Todos los fenómenos dispersivos llevan asociados un tiempo de relajación que les caracteriza. Reordenando la expresión (1.3) del factor de Clausius Mossotti se obtiene:

$$\tilde{f}_{\text{CM}}(\omega) = \left(\frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \right) \left(\frac{i\omega\tau_0 + 1}{i\omega\tau_{\text{MW}} + 1} \right) \quad (1.4)$$

donde

$$\tau_{\text{MW}} = \frac{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \quad \text{y} \quad \tau_0 = \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\sigma_p - \sigma_m} \quad (1.5)$$

son las constantes de tiempo de relajación que caracterizan el fenómeno dispersivo intrínseco de una partícula homogénea. En concreto, la constante τ_{MW} está asociada con el efecto Maxwell-Wagner de acumulación de carga libre en la superficie de la partícula. Haciendo un análisis de \tilde{f}_{CM} en los rangos de baja y alta frecuencia según la ecuación (1.4), encontramos que

$$\lim_{\omega\tau_{\text{MW}} \rightarrow 0} \tilde{f}_{\text{CM}} = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \quad (1.6)$$

$$\lim_{\omega\tau_{\text{MW}} \rightarrow \infty} \tilde{f}_{\text{CM}} = \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m} \quad (1.7)$$

De acuerdo con la relación (1.6), en el límite de bajas frecuencias es la conductividad, y por tanto la carga libre, la que domina el comportamiento de la partícula bajo el campo, mientras que en el rango de altas frecuencias, ecuación (1.7), es la permitividad la que gobierna el proceso de relajación interfacial.

El factor de Clausius-Mossotti es, de este modo, el que determina el espectro de la fuerza y el torque que actúan sobre una partícula cuando se encuentra bajo un campo eléctrico no uniforme que barre un rango de frecuencias. Un ejemplo típico del aspecto de este espectro está recogido en la Figura 1.3. En él quedan reflejadas las componentes real e imaginaria

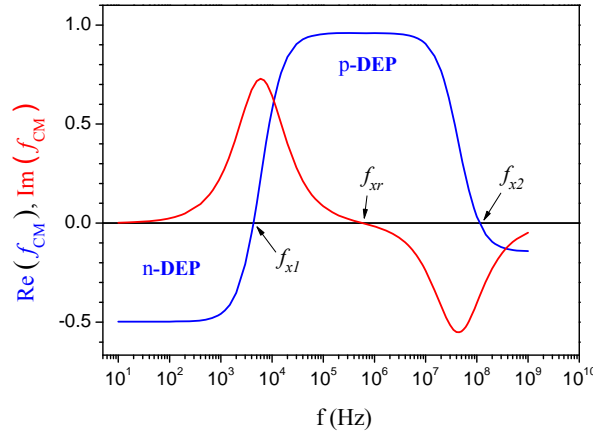


Figura 1.3. Espectro típico de una célula esférica rodeada por una membrana sometida a un campo eléctrico no uniforme. Los parámetros asociados a citoplasma, membrana y medio en el que se encuentra suspendida son, respectivamente, $\varepsilon_c = 50\varepsilon_0$, $\sigma_c = 0.5 \text{ S/m}$, $\varepsilon_m = 15\varepsilon_0$, $\sigma_m \approx 0$ y $\varepsilon_{\text{ext}} = 80\varepsilon_0$, $\sigma_{\text{ext}} = 1.5 \text{ mS/m}$.

de \tilde{f}_{CM} , a las que son proporcionales la fuerza DEP y el torque ER respectivamente. Aparecen además dos dispersiones características de una partícula con una capa, una creciente y otra decreciente, en las regiones de baja y alta frecuencia respectivamente, dentro del rango de radiofrecuencias. Las frecuencias asociadas a estos fenómenos dispersivos son las llamadas frecuencias de cruce, a las que $\text{Re}(\tilde{f}_{CM}) = 0$, o lo que es lo mismo, las propiedades dieléctricas efectivas de la célula coinciden con las del medio. Mediante el estudio de la variación de f_{x1} respecto a la conductividad del medio externo, se han extraído en numerosas ocasiones las propiedades dieléctricas de diversas células (Huang *et al.* 1996; Chan *et al.* 1997; Gascoyne *et al.* 1997; Pethig *et al.* 2002; Ratanachoo *et al.* 2002). De hecho, f_{x1} se encuentra en el rango de valores de frecuencias en el que la composición e integridad de la membrana celular son los principales factores a tener en cuenta. Por su parte, la frecuencia de cruce f_{x2} apenas ha sido considerada hasta el momento, muchas veces debido a las limitaciones de frecuencia de los generadores de señal empleados para el proceso experimental. Por encontrarse en altas frecuencias, se puede deducir que f_{x2} debería reflejar las propiedades del citoplasma celular, que se hacen evidentes en el momento en que la membrana se hace transparente a la frecuencia del campo eléctrico aplicado. Así lo explican en sus trabajos Ratanachoo (Ratanachoo *et al.* 2002) y Casterllarnau (Castellarnau *et al.* 2006), donde afirman la dependencia de f_{x2} con los parámetros dieléctricos del citoplasma, llegando a extraer una medida directa de la conductividad del citoplasma a partir de f_{x2} . Correspondientemente, la frecuencia f_{xr} es aquella a la que el fenómeno electrorotacional cesa, es decir $\text{Im}(\tilde{f}_{CM}) = 0$ por lo que la partícula tiene una velocidad angular nula. Como se observa en la figura 1.3, la frecuencia de cruce f_{xr} tiene una mayor indeterminación debido a la disposición tangencial de la curva respecto al eje de abscisas. Por esto, f_{xr} no es una frecuencia útil para extraer experimentalmente información dieléctrica sobre la partícula.

Estos dos fenómenos electrocinéticos, dielectroforesis y electrorotación, que aparecen normalmente asociados, pueden analizarse de forma independiente. Aunque el presente trabajo de investigación se centra en la aplicación de la dielectroforesis para la caracterización celular, la electrorotación ofrece también la posibilidad de extraer información tanto estructural como fisiológica de la célula. Mediante un mayor acercamiento a estos fenómenos se expone la base teórica sobre la que se apoya este estudio, considerando previa y brevemente la dinámica de las partículas expuestas a la electrocinética AC.

1.4.1. DINÁMICA DE PARTÍCULAS EN FENÓMENOS ELECTROKINÉTICOS AC

Puede deducirse de la ecuación (1.2), que a medida que las dimensiones de la partícula se reducen, es necesario aumentar el gradiente de campo eléctrico para inducir su movimiento por medio de una fuerza DEP. Los tamaños de las biopartículas sometidas a dielectroforesis varían desde las 0.01 μm de algunos virus, pasando por bacterias de entre 0.5 y 5 μm , hasta llegar a las 15 μm de las células animales más grandes. Normalmente, estas partículas se suspenden en medios acuosos cuyas conductividades o concentraciones iónicas oscilan entre

10^{-3} y 1 S m^{-1} . El movimiento de estas partículas suspendidas en un medio iónico bajo la acción de un campo eléctrico, puede estar determinado por múltiples fuerzas actuando sobre ellas, que enmascaran mutuamente sus efectos. Entre estas fuerzas se encuentran las que actúan directamente, como la fuerza dielectroforética, la fuerza browniana o las fuerzas de sedimentación, y las que afectan indirectamente a la partícula como consecuencia de los cambios ocurridos en las propiedades del fluido, las fuerzas electrohidrodinámicas y eletrotérmicas. Mediante el control de ciertos factores experimentales como la conductividad del medio de suspensión, la frecuencia y voltaje del campo aplicado, así como las dimensiones y geometría del dispositivo, puede llegar a inducirse el movimiento de las partículas de forma determinística y controlada.

A. Fuerza dielectroforética, fuerza de sedimentación y movimiento Browniano

Diversos estudios sobre la dinámica de partículas (Ramos *et al.* 1998; Green *et al.* 1999; Ramos *et al.* 1999; Green *et al.* 2000; Castellanos *et al.* 2003; Castellanos *et al.* 2004), presentan el análisis de la velocidad inducida sobre una partícula esférica de radio a suspendida en un fluido de viscosidad η y bajo la acción de una fuerza externa \mathbf{F} , en base a la ecuación del movimiento,

$$m \frac{d\mathbf{v}}{dt} = -6\pi\eta a(\mathbf{v} - \mathbf{u}) + \mathbf{F} \quad (1.8)$$

siendo m y \mathbf{v} la masa y la velocidad de la partícula respectivamente, \mathbf{u} la velocidad del fluido, y el primer término del segundo miembro representando la fuerza de arrastre del fluido sobre la partícula. Resolviendo la ecuación se obtiene la velocidad \mathbf{v} de la partícula

$$\mathbf{v} = \left(\mathbf{u} + \frac{\mathbf{F}}{\xi} \right) \left[1 - e^{-(\xi/m)t} \right] \quad (1.9)$$

donde se ha supuesto que la partícula parte del reposo, y que $\xi = 6\pi\eta a$ es el coeficiente de fricción. La partícula aumenta su velocidad hasta alcanzar una velocidad terminal \mathbf{v} , en un tiempo característico $\tau = m / \xi$. Para biopartículas este tiempo es del orden de 10^{-6} s, resultando ser mucho menor que el tiempo de observación (~ 1 ms). Despreciando por tanto el proceso de aceleración de la partícula, esta se mueve a una velocidad terminal dada por la expresión

$$\mathbf{v} = \mathbf{u} + \frac{\mathbf{F}}{\xi} \quad (1.10)$$

Entonces, toda medida de la velocidad de la partícula es una medida de la velocidad del fluido y la velocidad inducida por la fuerza a la que se encuentra sometida. A partir de esta expresión se deducen las velocidades inducidas sobre una partícula por las fuerzas browniana, dielectroforética y gravitatoria.

Suponiendo un campo eléctrico de fase constante, según la ecuación (1.2) la fuerza DEP vendrá dada por

$$\langle \mathbf{F}_{\text{DEP}}(t) \rangle = 2\pi\epsilon_m a^3 \text{Re}(\tilde{f}_{\text{CM}}) \nabla \mathbf{E}_{\text{rms}}^2 \quad (1.11)$$

De acuerdo con la expresión (1.10), la velocidad dielectroforética inducida sobre una partícula esférica de radio a resulta

$$\mathbf{v}_{\text{DEP}} = \frac{a^2 \epsilon_m}{3\eta} \text{Re}(\tilde{f}_{\text{CM}}) \nabla \mathbf{E}_{\text{rms}}^2 \quad (1.12)$$

Por simplicidad del análisis, se supone un campo eléctrico AC sobre un par de electrodos planos semi-infinitos, de longitud milimétrica, y separados una distancia micrométrica, cuya reacción se muestra en la Figura 1.4. La expresión analítica para el campo eléctrico despreciando los efectos de borde, es

$$\mathbf{E}(r) = \frac{V}{\pi r} \mathbf{n}_\theta \quad (1.13)$$

donde V es el voltaje aplicado, y r es la distancia al centro del gap. Suponiendo además que el factor de Clausius-Mossotti toma el valor unidad, la estimación de la velocidad inducida queda

$$v_{\text{DEP}} \approx 0.03 \frac{a^2 \epsilon_m}{\eta} \frac{V^2}{r^3} \quad (1.14)$$

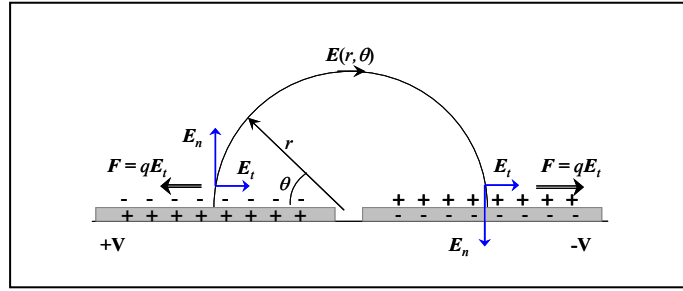


Figura 1.4. Dibujo esquemático del modelo analítico para el campo eléctrico creado por dos placas paralelas semi-infinitas separadas por un pequeño gap. Al cubrir los electrodos con una solución acuosa se induce una doble capa sobre los electrodos, ocasionando un efecto electro-osmótico: la carga inducida se ve sometida a la acción de la componente tangencial del campo, provocando el movimiento del fluido desde el borde interno hacia el centro de los electrodos.

Bajo la influencia de la gravedad las partículas sufren la llamada fuerza de sedimentación, gobernada por el principio de Arquímedes, que las lleva hacia la superficie de los electrodos. La expresión general para esta fuerza ejercida sobre una partícula de volumen v y densidad ρ_p , en un medio de densidad ρ_m , viene dada por

$$F = v(\rho_p - \rho_m)g \quad (1.15)$$

donde g es la aceleración de la gravedad. La velocidad estimada para el caso de una partícula esférica de radio a por efecto de la gravedad resulta

$$v_g \approx 0.2 \frac{a^2 |\rho_p - \rho_m|}{\eta} g \quad (1.16)$$

Puede deducirse de las ecuaciones (1.14) y (1.16) que, en periodos cortos de observación, el movimiento gravitacional de una partícula es menor que el causado por DEP, dado que ambos dependen de a^2 y de la distancia r de la partícula a los electrodos es del orden de micras.

Por su parte, aunque el promedio de la fuerza aleatoria sobre una partícula debido al movimiento browniano es cero, su desplazamiento sigue un perfil gaussiano con una media de desplazamientos dada por

$$|\Delta \bar{x}|^2 = 2D\Delta t = \frac{k_B T}{3\pi a \eta} \Delta t \quad (1.17)$$

donde D es el coeficiente de difusión, k_B la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta y Δt el tiempo de observación. Para que una fuerza F actuando en una partícula durante un intervalo de tiempo Δt sea determinística, ésta ha de provocar un desplazamiento mayor que el debido al movimiento aleatorio. Es decir, sea

$$\Delta \bar{x} = \frac{F}{\xi} \Delta t \quad (1.18)$$

el desplazamiento de la partícula según la ecuación (1.10) bajo la fuerza F . Si este desplazamiento es mayor que el dado por la ecuación (1.17), tal que

$$|F| > \sqrt{\frac{18k_B T}{\Delta t}} \xi \quad (1.19)$$

donde se han tenido en cuenta los tres grados de libertad de la partícula, entonces el movimiento generado por F será determinístico. Según esta ecuación, cuanto mayor sea el periodo de observación, menor será la fuerza requerida para provocar un movimiento determinístico. Pero este análisis es sólo aplicable al caso de partículas aisladas, o bajas concentraciones de partículas, ya que para altas concentraciones de partículas habrían de considerarse los efectos de interacción. Aunque la fuerza browniana se había considerado como el principal impedimento para la correcta experimentación dielectroforética sobre partículas muy pequeñas (Pohl 1978), en trabajos recientes se demuestra cómo el virus del mosaico del tabaco –bacilo de dimensiones 300 nm x 18 nm– y el virus del *Herpes simplex* –esfera de 250 nm de diámetro–, son movidos bajo fuerzas dielectroforéticas del orden de 10^{-15} N y 10^{-14} N, respectivamente, y con campos del orden de 10^6 V/m (Morgan y Green 1997; Hughes *et al.* 2001). Del mismo modo, se ha llevado a cabo la manipulación dielectroforética de macromoléculas, lo que demuestra que, incluso para partículas de tan reducido tamaño, el

movimiento aleatorio browniano no es suficiente para apantallar la colección dielectroforética (Washizu *et al.* 1994). Todo esto ha sido posible por la introducción de las estructuras micro y nanométricas para la fabricación de los electrodos, lo que ha facilitado la generación de campos eléctricos suficientemente intensos, sin necesidad de grandes voltajes, haciendo de la dielectroforesis un fenómeno determinístico.

B. Fuerzas electrotérmicas y electrohidrodinámicas

Aplicar un campo eléctrico no uniforme sobre unos electrodos de dimensiones micrométricas rodeados de un medio electrolítico, implica la generación de un movimiento del fluido, principalmente por efectos electrotérmicos y electro-osmóticos.

Respecto a los fenómenos electrotérmicos, el análisis parte de la ecuación del balance energético en base a la distribución de temperatura,

$$k\nabla^2 T + \sigma E^2 = \rho_m c_p \left(\frac{\partial T}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) T \right) \quad (1.20)$$

donde k y σ son la conductividad térmica y eléctrica del medio fluido respectivamente, ρ_m su densidad, T la temperatura absoluta, y c_p el calor específico. Tras la aplicación del campo eléctrico, el sistema alcanza el estado estacionario en aproximadamente 1 ms, por lo que para frecuencias mayores de 1 kHz el cambio de temperatura es despreciable. Además, en condiciones de equilibrio ($t > 1$ ms), el aumento de temperatura que pueda darse no depende del movimiento del fluido. De este modo, la ecuación del balance energético de fluidos queda dependiente del efecto Joule, y se reduce a la ecuación de Poisson:

$$k\nabla^2 T + \sigma \langle E^2 \rangle = 0 \quad (1.21)$$

La densidad de potencia generada sobre el fluido por este campo viene dada, de acuerdo con (1.13), por

$$W = \sigma \langle E^2 \rangle = \frac{\sigma V_{rms}^2}{\pi^2 r^2} \quad (1.22)$$

Así, la ecuación de balance energético en coordenadas polares resulta:

$$\frac{k}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{k}{r^2} \frac{\partial^2 T}{\partial \theta^2} = - \frac{\sigma V_{rms}^2}{\pi^2 r^2} \quad (1.23)$$

Simplificando para un sistema ideal como el descrito en la Figura 1.4, y bajo la hipótesis de que los electrodos se encuentran a temperatura constante, el incremento de temperatura del sistema en estado estacionario viene dado por

$$\Delta T = \frac{\sigma V_{rms}^2}{2\pi k} \theta \left(1 - \frac{\theta}{\pi} \right) \quad (1.24)$$

El incremento máximo de temperatura se produce cuando el ángulo $\theta = \pi/2$, es decir, $\Delta T = \sigma V_{rms}^2 / 8k$. Para un sistema típico de microelectrodos, compuesto por dos tiras paralelas de dimensiones medias $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 2 \text{ mm}$ y separadas $50 \mu\text{m}$, sobre las que se aplica un voltaje de 10 V , la potencia disipada en el sistema cuando la conductividad del fluido es 0.01 S/m , resulta ser de 8 mW . El máximo incremento de temperatura que se da en el centro del espaciado entre los electrodos es de apenas $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, si bien, a través de la ecuación (1.24) se deduce la importancia de emplear soluciones poco conductoras para evitar un excesivo incremento de temperatura que pudiera provocar la desnaturalización del material biológico expuesto.

Las variaciones de temperatura causadas por la no uniformidad de campo eléctrico y, por tanto, de la densidad de potencia sobre el sistema, provocan cambios locales en la densidad, viscosidad, permitividad y conductividad del medio fluido, dando lugar así a otras fuerzas sobre el fluido. Los gradientes de la permitividad y la conductividad que provoca el gradiente de temperatura tienen las expresiones $\nabla\epsilon = (\partial\epsilon / \partial T) \nabla T$ y $\nabla\sigma = (\partial\sigma / \partial T) \nabla T$. Dados los pequeños cambios de temperatura, los incrementos relativos de la permitividad $\Delta\epsilon/\epsilon$ y conductividad $\Delta\sigma/\sigma$ son mucho menores que la unidad (Ramos *et al.* 1998), por lo que la fuerza eléctrica sobre el fluido por unidad de volumen es

$$\langle F_e \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} \left[\left(\frac{(\sigma \nabla \epsilon - \epsilon \nabla \sigma) \mathbf{E}}{\sigma + i\omega\epsilon} \right) \mathbf{E}^* - \frac{1}{2} |\mathbf{E}|^2 \nabla \epsilon \right] \quad (1.25)$$

El primer término a la derecha de la igualdad representa la fuerza de Coulomb, y el segundo la fuerza dieléctrica. Cada una de ellas es dominante en un rango de frecuencias, dándose la transición entre ambas a una frecuencia muy próxima a la inversa del tiempo de relajación del electrolito, $\tau = \epsilon/\sigma$. A frecuencias $\omega \gg \sigma/\epsilon$ (mayores que la frecuencia característica de relajación de carga del medio) la fuerza dieléctrica es el factor dominante en la ecuación (1.25), mientras que la fuerza de Coulomb domina en bajas frecuencias, $\omega \ll \sigma/\epsilon$. Para los valores experimentales de la conductividad de las soluciones salinas empleadas, del orden de 10^{-3} S/m , la frecuencia de relajación de la carga del electrolito se encuentra en el rango de 10^5 Hz , por lo que los estudios dielectroforéticos realizados en un rango de frecuencias entre 10^4 hasta 10^9 Hz se verán mínimamente afectados por estos efectos electrotérmicos.

Por su parte, los efectos de convección debidos a la influencia de los cambios térmicos sobre la densidad del medio fluido, se analizan a través de la fuerza de empuje según la ecuación

$$F_g = \frac{\partial \rho_m}{\partial T} g \Delta T \quad (1.26)$$

El incremento de temperatura dado por la ecuación (1.24), provoca una fuerza de empuje

$$F_g = \frac{\sigma V_{rms}^2}{2\pi k} \theta \left(1 - \frac{\theta}{\pi} \right) \frac{\partial \rho_m}{\partial T} g \quad (1.27)$$

Haciendo una estimación del valor de esta fuerza según los parámetros anteriores, con $(1/\rho_m)(\partial\rho_m/\partial T)=10^{-4}$ por grado, con $g=9.81 \text{ m s}^{-2}$, se obtiene una fuerza de empuje máximo $F_g = 3.25 \cdot 10^{-16} \text{ N}$, considerando el volumen a partir del espaciado entre los electrodos, y de su dimensión longitudinal, $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} \times 2 \text{ mm}$. Por tanto, los fenómenos de convección natural que pudieran presentarse al emplear estructuras de microelectrodos son despreciables frente a cualquier otro fenómeno.

Así, por lo anteriormente expuesto, puede deducirse que el flujo de fluido de origen electrotérmico en los experimentos electrocinéticos AC es despreciable, y llega a tener importancia únicamente en los casos en que se aplican altos voltajes en medios fuertemente conductores.

Pero el movimiento del fluido en la experimentación electrocinética puede surgir también por efectos electro-osmóticos AC, consecuencia de la interacción del campo con la carga inducida sobre la superficie de los electrodos. Esta carga inducida sobre la interfase electrodo-electrolito es conocida como doble capa. Su espesor típico, suponiendo el electrolito una solución salina formada por iones monovalentes, viene dado por la longitud de Debye,

$$\lambda_D = 1.764 \times 10^{-11} \sqrt{T/c} \quad (1.28)$$

que depende de la concentración iónica c del electrolito y de su temperatura T . La longitud de Debye, del orden de varios nanómetros para las condiciones normales de experimentación electrocinética, es despreciable frente al tamaño típico del sistema, del orden de micras. Tal como aparece en la Figura 1.4, la carga inducida al aplicar una diferencia de potencial AC sobre cada electrodo rodeado por el electrolito, se ve sometida a la acción de la componente tangencial del campo, sufriendo una fuerza dirigida desde el centro del gap hacia la superficie de los electrodos. Esto origina que el fluido se mueva desde las regiones de mayor intensidad de campo, sobre los bordes de los electrodos, hacia la superficie de los mismos. El promedio de esta velocidad viene dada por la generalización de la fórmula de Helmholtz-Smoluchowsky para la velocidad de deslizamiento (Green *et al.* 2002),

$$\langle v_{dest} \rangle = \frac{\varepsilon}{2\eta} \Lambda \text{Re}[(\Delta\phi_{DL}) E_t^*] = -\frac{\varepsilon}{4\eta} \Lambda \frac{\partial}{\partial x} |\phi - V_j|^2 \quad (1.29)$$

donde Λ es un parámetro empírico que determina la razón entre la caída de potencial en la capa difusa –la capa de iones móviles– y la caída del voltaje a través del total de la doble capa, $\Delta\phi_{DL}$; E_t^* es la componente tangencial del campo en la parte externa de la capa difusa, donde * indica el complejo conjugado; ϕ es el potencial de la parte externa de la capa difusa, y V_j el potencial aplicado sobre los electrodos. Suponiendo una doble capa ideal, Λ es dada por

$$\Lambda = \frac{C_s}{C_s + C_d} \quad (1.30)$$

con C_s y C_d la capacidad por unidad de superficie de la capa de Stern –capa compacta– y la capa difusa, respectivamente. Mediante la teoría de circuitos aplicada sobre una disposición de resistencias y condensadores se ha estimado la caída de potencial a través de la doble capa como (Castellanos *et al.* 2003)

$$\Delta\phi_{DL} = \frac{V/2}{1 + i\omega\pi Cr/2\sigma} \quad (1.31)$$

siendo C la capacidad dada por ΛC_d , y r la distancia desde el centro del gap entre los electrodos, hasta el punto considerado sobre la superficie de los electrodos. Considerando los electrodos perfectamente polarizables, es decir, no se da electrólisis sobre su superficie, y un comportamiento lineal de la doble capa, que actúa como un condensador, según la aproximación de Debye-Hückel, su capacidad vienen dada por

$$C_d = \frac{\varepsilon_m}{\lambda_D} \quad (1.32)$$

donde ε_m es la permitividad del medio y λ_D la longitud de Debye. Sustituyendo en la ecuación (1.29), la velocidad de deslizamiento resulta

$$v_{dest} = \frac{\varepsilon V^2}{8\eta r} \Lambda \frac{\Omega^2}{(1 + \Omega^2)^2} \quad (1.33)$$

donde bajo el símbolo Ω , frecuencia adimensional, se han agrupado los factores

$$\Omega = \frac{\pi\omega Cr}{2\sigma} \quad (1.34)$$

Mediante la frecuencia adimensional (1.34) se establece la dependencia frecuencial de la velocidad del fluido: ésta alcanza su máximo cuando $\Omega = 1$, es decir, cuando $\omega_0 = 2\sigma/C\pi r$. Siendo $C = \Lambda C_d = \Lambda\varepsilon/\lambda_D$, resulta $\omega_0 = 2\sigma\lambda_D/\pi r\varepsilon\Lambda$. Esta frecuencia es varios órdenes de magnitud menor que la frecuencia angular de relajación de carga del electrolito, $\omega_c = \sigma/\varepsilon$. Suponiendo una conductividad del orden de 10 mS/m, y un gap entre los electrodos de 25 μm , la frecuencia $f_0 = \omega_0/2\pi$, a la que la velocidad de deslizamiento del fluido es máxima, es de varias decenas de hertzios, mientras que f_c es del orden de 10^6 Hz. El rango de valores de f_0 normalmente oscila entre 10 y 10^5 Hz, frente a los 10^5 a 10^8 Hz que puede tomar f_c . A frecuencias menores que f_0 , la mayor parte del voltaje aplicado cae a través de la doble capa, con lo que el campo eléctrico es muy pequeño; mientras, a frecuencias mucho mayores que f_0 , la caída de potencial se produce en el electrolito y la densidad de carga acumulada en la doble capa es mínima. En ambos casos, la velocidad electro-osmótica de deslizamiento es muy pequeña.

Por tanto, los efectos electro-osmóticos AC son dominantes cuando se trabaja a frecuencias relativamente bajas (~ 1 kHz) y en sistemas cuya longitud característica es del orden de micras. Sin embargo, estos efectos disminuyen gradualmente al aumentar la frecuencia.

C. Leyes de escala

A pesar de que de la expresión de la fuerza DEP no podemos inferir directamente nada acerca de los electrodos que crean el campo eléctrico, la ley de escala que establece la dependencia de la fuerza respecto a los parámetros de los electrodos se expresa como

$$|F_{\text{DEP}}| \propto V^2 / L_e^3 \quad (1.35)$$

siendo L_e la longitud característica entre los electrodos. A través de esta ley se deduce que la magnitud de la fuerza dielectroforética sobre una partícula aumenta si reducimos las dimensiones del espacio entre los electrodos, manteniendo su geometría y el voltaje aplicado. La reducción de las dimensiones de los electrodos favorece el predominio de la fuerza DEP sobre la gravitacional cuando se tratan partículas submicrométricas, según las ecuaciones (1.14) y (1.16). Asimismo, los efectos electro-osmóticos y electrotérmicos permanecen apantallados por el fenómeno dielectroforético cuando el tamaño del sistema disminuye. El calentamiento por efecto Joule se controla según (1.35), al poder generar un gradiente de campo suficientemente intenso sin recurrir al aumento del potencial, reduciendo el espacio entre los electrodos.

1.4.2. DIELECTROFORESIS

El movimiento de traslación que surge de la interacción de un campo eléctrico no uniforme con el momento dipolar inducido sobre una partícula es el fenómeno previamente introducido denominado dielectroforesis. Suponiendo que la contribución a la fuerza dielectroforética por parte de los términos multipolares de mayor orden son despreciables, podremos hacer un análisis fenomenológico mediante el método del momento dipolar efectivo. Dicha aproximación consiste en suponer el dipolo efectivo de una partícula como un dipolo puntual de carga libre que, cuando está inmerso en el mismo fluido dieléctrico, crea el mismo campo dipolar que la partícula original. Para dieléctricos lineales e isótropos bajo un campo eléctrico aplicado a una frecuencia determinada, la relación entre el campo eléctrico $\tilde{\mathbf{E}} = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$ y el momento dipolar $\tilde{\mathbf{p}}$ de una partícula es

$$\tilde{\mathbf{p}} = \tilde{\alpha}(\omega) \tilde{\mathbf{E}} \quad (1.36)$$

donde $\tilde{\alpha}$ es la polarizabilidad efectiva de la partícula. El promedio temporal de la fuerza que actúa sobre esta partícula está dada por la expresión:

$$\langle F_{\text{DEP}} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} (\tilde{\mathbf{p}} \nabla) \tilde{\mathbf{E}}^* \quad (1.37)$$

donde $\tilde{\mathbf{E}}^*$ el complejo conjugado del campo eléctrico. La evaluación de dicho momento proporcionará, por tanto, la fuerza dielectroforética.

Las ecuaciones de Maxwell en aproximación cuasi-estática son adecuadas para el caso de corrientes y frecuencias típicas de los fenómenos electrocinéticos que tratamos:

$$\mathbf{E} = -\nabla\phi \quad (1.38)$$

$$\nabla \cdot (\sigma \mathbf{E}) + \frac{\partial \rho}{\partial t} = 0 \quad (1.39)$$

$$\nabla \cdot (\epsilon \mathbf{E}) = \rho \quad (1.40)$$

Para una partícula dieléctrica homogénea, resolvemos la ecuación de Laplace, $\nabla^2\phi=0$, en coordenadas esféricas con las condiciones de contorno adecuadas –continuidad del potencial eléctrico y de la componente normal del vector desplazamiento $\tilde{\epsilon}\mathbf{E}$ en la interfase–. En el caso de partícula esférica homogénea e isotrópica de radio a obtenemos la expresión del momento dipolar efectivo de $\tilde{\mathbf{p}} = 4\pi\epsilon_m a^3 \tilde{f}_{\text{CM}}(\omega)\tilde{\mathbf{E}}$, a partir del cual la fuerza dielectroforética para el caso de un campo de fase uniforme resulta, de acuerdo con las ecuaciones (1.36) y (1.37) planteadas anteriormente,

$$\langle \mathbf{F}_{\text{DEP}} \rangle = 2\pi\epsilon_m a^3 \text{Re}[\tilde{f}_{\text{CM}}(\omega)] \nabla \tilde{\mathbf{E}}_{\text{rms}}^2 \quad (1.41)$$

Como se ha comentado, \tilde{f}_{CM} es el factor complejo de Clausius-Mossotti, el cual contiene toda la información relativa a la magnitud y la fase del momento dipolar, y por extensión, de la fuerza DEP en términos de la frecuencia angular. Para una partícula esférica, la parte real de \tilde{f}_{CM} tiene como valores límites 1 y -1/2, y depende además de la frecuencia del campo, de la permitividad compleja del medio. El factor de Clausius-Mossotti determina por tanto el sentido del movimiento de las partículas bajo el campo eléctrico: si $\text{Re}(\tilde{f}_{\text{CM}}) > 0$ se da dielectroforesis positiva y las partículas se mueven hacia regiones de alto campo eléctrico; mientras, si $\text{Re}(\tilde{f}_{\text{CM}}) < 0$ se trata de dielectroforesis negativa y las partículas se alejan de dichas regiones hacia aquellas de menor intensidad de campo. Asimismo, según el factor de Clausius-Mossotti, el espectro dielectroforético de una partícula está determinado por la diferencia existente entre las propiedades eléctricas del medio y de la partícula en el rango de frecuencias barrido por el campo eléctrico. De la dependencia con el cuadrado del campo, se deduce cómo la polaridad de éste no influye en el movimiento de las partículas, y que el efecto dielectroforético puede observarse tanto para campos eléctricos AC alternos como para campos eléctricos continuos DC.

Como se ha presentado en el breve estudio de la dinámica de partículas, la dependencia de la fuerza DEP respecto al tamaño y geometría de la partícula es determinante. La dielectroforesis se detecta en partículas de hasta un nanómetro de diámetro, por debajo de la cual las fuerzas térmicas ya son dominantes. Partículas del orden de micras de diámetro que experimentan un fuerte movimiento dielectroforético están sujetas a fuerzas DEP del orden de 10^{-11} N, unas 40 veces mayores que la fuerza gravitatoria sobre las mismas, y alrededor de $2 \cdot 10^5$ veces mayores que las fuerza brownianas. En cuanto a la forma de la partícula, para geometrías distintas de la esférica, y en concreto, para partículas elipsoidales, es necesario introducir un factor geométrico que generaliza la expresión del factor de Clausius-Mossotti.

Este factor, derivado de la solución de la ecuación de Laplace, proporciona una expresión analítica para tales casos de anisotropía geométrica.

Asimismo, en la ecuación (1.41) queda reflejado el hecho de que la fuerza dielectroforética se da únicamente en el caso de que las partículas se encuentren bajo un campo eléctrico espacialmente no uniforme. Pero la no uniformidad puede provenir además de la distorsión introducida en dicho campo por los momentos dipolares inducidos mutuamente entre partículas muy próximas. En tal caso, las partículas se atraen entre sí formando cadenas conocidas por el nombre de “*pearl chains*”. Este fenómeno de interacción, tratado en un capítulo aparte, es de singular importancia en el campo de la electrorreología.

1.4.3. ELECTROROTACIÓN

El fenómeno de la electrorotación (ER), en el que se induce un torque sobre la partícula bajo un campo eléctrico no uniforme, fue observado en determinadas ocasiones junto con los primeros experimentos de dielectroforesis llevados a cabo por Pohl. Sin embargo, la electrorotación como fenómeno controlado e independiente de la dielectroforesis fue introducida por Arnold y Zimmerman en 1982 (Arnold y Zimmermann 1982). En la ER, una partícula neutra bajo un campo eléctrico rotatorio gira como consecuencia de la interacción del campo con el momento dipolar inducido: el giro será, bien en el sentido de giro del campo (co-campo) o bien en el sentido contrario (anti-campo). Dicho campo, caracterizado por la no uniformidad en su fase, puede crearse mediante cuatro electrodos dispuestos como muestra la Figura 1.5, excitados con voltajes adelantados en fase 90° entre electrodos adyacentes.

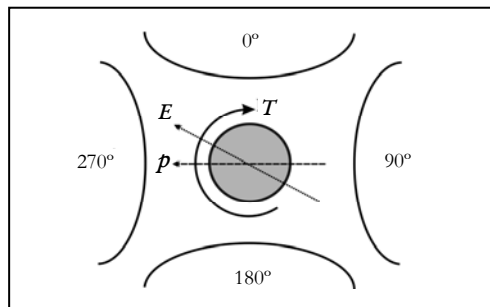


Figura 1.5. Esquema de la electrorotación de una partícula polarizable en un campo eléctrico rotatorio generado por cuatro electrodos con voltajes desfasados 90° .

Del mismo modo que en el caso de la dielectroforesis, la electrorotación puede analizarse considerando la interacción del campo eléctrico rotacional con el momento inducido sobre la partícula. Recurriendo nuevamente al método del momento dipolar efectivo, el torque promediado en un periodo de tiempo viene dado por la expresión:

$$\langle T_{ER} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} [\tilde{p} \times \tilde{E}^*] \quad (1.42)$$

donde \tilde{E}^* es el complejo conjugado del campo eléctrico. El giro co-campo se produce cuando el momento dipolar \tilde{p} lleva un desfase respecto al campo E desde 0° a 180° , mientras que el giro anti-campo se produce cuando el momento \tilde{p} adelanta al campo E en ese mismo rango. Por medio de la expresión del momento dipolar efectivo de una partícula esférica, se obtiene que la electrorotación es proporcional a la parte imaginaria del factor de Clausius-Mossotti,

$$\langle T_{ER} \rangle = -4\pi\epsilon_m a^3 \text{Im}[\tilde{f}_{CM}(\omega)] E_{rms}^2 \quad (1.43)$$

determinando que si $\text{Im}(\tilde{f}_{CM}) > 0$ el torque ejercido será negativo y la partícula rotará en sentido inverso al campo, y viceversa cuando $\text{Im}(\tilde{f}_{CM}) < 0$. Considerando la fricción con el medio de viscosidad η , la velocidad de rotación de la partícula será,

$$\Omega_{ER} = -\frac{\epsilon_m}{2\eta} \text{Im}[\tilde{f}_{CM}(\omega)] E_{rms}^2 \quad (1.44)$$

La ecuación (1.44), o su equivalente (1.43), describen el comportamiento de la partícula cuando ésta se encuentra en la zona central de la configuración simétrica de electrodos de la figura 1.5, donde el campo eléctrico rotatorio es uniforme. Sin embargo, cerca de los bordes de los electrodos, tanto la dielectroforesis como la electrorotación están presentes en el comportamiento electrocinético de la partícula.

Al igual que la dielectroforesis, y en numerosas ocasiones juntamente con ella, la electrorotación se ha empleado como técnica analítica para la caracterización celular, proporcionando, con la ayuda de un modelo adecuado, un conocimiento del estado fisiológico de las células (Pastushenko *et al.* 1985; Arnold y Zimmermann 1988; Zhou *et al.* 1996; Chan *et al.* 1997; Holzel 1997; De Gasperis *et al.* 1998; Budde *et al.* 1999; Holzel 1999; Yang *et al.* 1999b; Cristofanilli *et al.* 2002; Reuss *et al.* 2004), permitiendo asimismo determinar posibles cambios celulares inducidos por agentes químicos o de cualquier otra clase (Huang *et al.* 1992; Wang *et al.* 1994; Egger y Donath 1995; Huang *et al.* 1995; Huang *et al.* 1996; Griffith y Cooper 1998; Archer *et al.* 1999; Dalton *et al.* 2001; Dalton *et al.* 2006).

1.4.4. OTROS FENÓMENOS ELECTROKINÉTICOS

Asociados a la dielectroforesis y la electrorotación, se han desarrollado otros fenómenos para la manipulación de partículas con distintas propiedades dieléctricas, mediante el uso de diferentes estructuras de microelectrodos y combinando la fuerza dielectroforética con otras fuerzas. Como mera reseña cabe citar:

A. Dielectroforesis de onda viajera – *Travelling-wave dielectrophoresis, twDEP*–.

Trabajando a frecuencias en las que las partículas sufren DEP negativa, es decir, que son repelidas por los electrodos, con un campo que se propaga como una onda viajera a través de los electrodos, se origina el fenómeno conocido por dielectroforesis de onda viajera. En este caso, la fuerza que actúa sobre las partículas es proporcional a la componente imaginaria del momento dipolar inducido, asociada también al fenómeno de la electrorotación según se

introdujo con la ecuación (1.2). En cambio, a diferencia de la ER, ahora el campo AC se aplica sobre una disposición lineal (“array”) de electrodos con una secuencia de fases idénticas al caso de la ER –cada electrodo adelantado en fase con respecto al último 90°. Así se genera una onda eléctrica que “viaja” a través de los electrodos interaccionando con el momento dipolar inducido sobre la partícula dieléctrica, ejerciendo una fuerza y un torque sobre la misma mientras se mueve a lo largo de los electrodos (Hughes *et al.* 1996; Morgan *et al.* 2001). El fenómeno queda recogido en la siguiente expresión (Huang *et al.* 1993):

$$F_{\text{wDEP}} = \frac{-4\pi\epsilon_m a^3 \text{Im}(\tilde{f}_{\text{CM}}) E_{\text{rms}}^2}{\lambda} \quad (1.45)$$

donde λ representa la longitud de la onda viajera, o lo que es lo mismo, la distancia periódica entre los electrodos de la misma fase. Esta técnica se ha empleado para realizar múltiples separaciones de células viables y no viables (Hughes *et al.* 1996; Talary *et al.* 1996; Goater *et al.* 1997; Goater y Pethig 1998; Cen *et al.* 2004), o separar eritrocitos de leucocitos en muestras de sangre (Morgan *et al.* 1997; Burt *et al.* 1998).

B. Fraccionamiento del flujo de campo dielectroforético – DEP-field flow fractionation, DEP-FFF –.

En este método se combinan las fuerzas hidrodinámicas con la fuerza dielectroforética para conseguir la separación de partículas. En la técnica de fraccionamiento de flujo (FFF) se emplean flujos laminares, no turbulentos, caracterizados por un bajo número de Reynolds. El flujo entra horizontalmente en la cámara con diferentes velocidades a diferentes alturas, dibujando un perfil parabólico como el mostrado en la Figura 1.6, donde las partículas más cercanas a la pared de la cámara viajan a menor velocidad que aquéllas que se encuentran inmersas en medio del flujo.

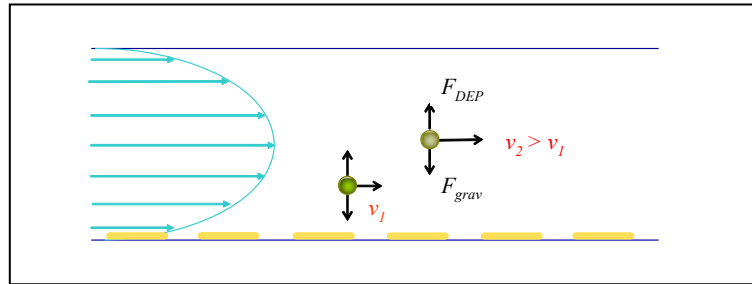


Figura 1.6. Disposición del fraccionamiento de flujo de campo dielectroforético, con la fuerza DEP actuando sobre dos tipos de partículas distintas.

En la DEP-FFF, gracias a la DEP negativa se provoca la levitación de las partículas a diferentes alturas en la cámara dependiendo de las características de cada célula; después, haciendo fluir el líquido sobre los electrodos como en la técnica FFF, se consigue separar las

partículas de acuerdo con sus propiedades dieléctricas y densidad. En este caso también se usan arrays de electrodos interdigitados formados por bandas planas paralelas, sobre los que se aplica un voltaje con fases relativas de 0° a 180° de forma consecutiva (Markx *et al.* 1997b; Cui y Morgan 2000). Mediante DEP-FFF se ha realizado la separación de partículas de látex de distintos tamaños (Markx *et al.* 1997a; Wang *et al.* 1998), separación de células de cáncer de mama y células madre hematopoyéticas (Huang *et al.* 1999) o dichas células cancerígenas de células sanguíneas (Yang *et al.* 1999a).

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Archer S, Morgan H y Rixon FJ (1999). *Electrorotation Studies of Baby Hamster Kidney Fibroblasts Infected with Herpes Simplex Virus Type 1*. Biophysical Journal 76(5): 2833.
- Arnold W y Zimmermann U (1982). *Rotating-Field-Induced Rotation and Measurement of the Membrane Capacitance of Single Mesophyll Cells of Arena Sativa*. Z. Naturforsch. 37c: 908.
- Arnold W y Zimmermann U (1988). *Electro-Rotation: Development of a Technique for Dielectric Measurements on Individual Cells and Particles*. J. Electrostatics 21: 151.
- Asami K, Takahashi Y y Takashima S (1989). *Dielectric-Properties of Mouse Lymphocytes and Erythrocytes*. Biochimica Et Biophysica Acta 1010(1): 49.
- Asbury CL y van den Engh G (1998). *Trapping of DNA in Nonuniform Oscillating Electric Fields*. Biophysical Journal 74(2): 1024.
- Becker FF, Wang XB, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J y Gascoyne PRC (1995). *Separation of Human Breast-Cancer Cells from Blood by Differential Dielectric Affinity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(3): 860.
- Beving H, Eriksson LEG, Davey CL y Kell DB (1994). *Dielectric-Properties of Human Blood and Erythrocytes at Radio Frequencies (0.2-10-Mhz) - Dependence on Cell-Volume Fraction and Medium Composition*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters 23(3): 207.
- Bothwell TP y Schwan HP (1956). *Electrical Properties of the Plasma Membrane of Erythrocytes at Low Frequencies*. Nature 178(4527): 265.
- Broche LM, Labeed FH y Hughes MP (2005). *Extraction of Dielectric Properties of Multiple Populations from Dielectrophoretic Collection Spectrum Data*. Physics in Medicine and Biology 50(10): 2267.
- Budde A, Grummer G y Knippel E (1999). *Electrorotation of Cells and Particles: An Automated Instrumentation*. Instrumentation Science & Technology 27(1): 59.
- Burt JPH, Pethig R, Gascoyne PRC y Becker FF (1990). *Dielectrophoretic Characterization of Friend Murine Erythroleukaemic Cells as a Measure of Induced-Differentiation*. Biochimica Et Biophysica Acta 1034(1): 93.
- Burt JPH, Pethig R y Talarly MS (1998). *Microelectrode Devices for Manipulating and Analysing Bioparticles*. Transactions of the Institute of Measurement and Control 20(2): 82.
- Carstensen E y Marquis R (1968). *Passive Electrical Properties of Microorganisms. 3. Conductivity of Isolated Bacterial Cell Walls*. Biophys J. 8(5): 536.
- Castellanos A, Gonzalez A, Ramos A, Green NG y Morgan H (2004). *Electrohydrodynamics in Microelectrode Structures*. Electrostatics 2003(178): 175.

- Castellanos A, Ramos A, Gonzalez A, Green NG y Morgan H (2003). *Electrohydrodynamics and Dielectrophoresis in Microsystems: Scaling Laws*. Journal of Physics D-Applied Physics 36(20): 2584.
- Castellarnau M, Errachid A, Madrid C, Juarez A y Samitier J (2006). *Dielectrophoresis as a Tool to Characterize and Differentiate Isogenic Mutants of Escherichia Coli*. Biophys. J. 91(10): 3937.
- Cen EG, Dalton C, Li Y, Adamia S, Pilarski LM y Kaler KVIS (2004). *A Combined Dielectrophoresis, Traveling Wave Dielectrophoresis and Electrorotation Microchip for the Manipulation and Characterization of Human Malignant Cells*. Journal of Microbiological Methods 58(3): 387.
- Cole KS (1972). *Membranes, Ions and Impulses*. University of California Press, Berkeley.
- Cole KS y Cole RH (1941). *Dispersion and Absorption in Dielectrics. 1. Alternating Current Characteristics*. Journal of Chemical Physics 9: 341.
- Cristofanilli M, De Gasperis G, Zhang LS, Hung MC, Gascoyne PRC y Hortobagyi GN (2002). *Automated Electrorotation to Reveal Dielectric Variations Related to Her-2/Neu Overexpression in MCF-7 Sublines*. Clinical Cancer Research 8(2): 615.
- Cui L y Morgan H (2000). *Design and Fabrication of Travelling Wave Dielectrophoresis Structures*. Journal of Micromechanics and Microengineering 10(1): 72.
- Chan KL, Gascoyne PRC, Becker FF y Pethig R (1997). *Electrorotation of Liposomes: Verification of Dielectric Multi-Shell Model for Cells*. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism 1349(2): 182.
- Chang DE y Petit N (2005). *Toward Controlling Dielectrophoresis*. International Journal of Robust and Nonlinear Control 15(16): 769.
- Dalton C, Goater AD, Drysdale J y Pethig R (2001). *Parasite Viability by Electrorotation*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 195(1-3): 263.
- Dalton C, Goater AD y Smith HV (2006). *Fertilization State of Ascaris Suum Determined by Electrorotation*. Journal of Helminthology 80(1): 25.
- De Gasperis G, Wang XB, Yang J, Becker FF y Gascoyne PRC (1998). *Automated Electrorotation: Dielectric Characterization of Living Cells by Real-Time Motion Estimation*. Measurement Science & Technology 9(3): 518.
- Docoslis A, Kalogerakis N y Behie LA (1999). *Dielectrophoretic Forces Can Be Safely Used to Retain Viable Cells in Perfusion Cultures of Animal Cells*. Cytotechnology 30(1-3): 133.
- Egger M y Donath E (1995). *Electrorotation Measurements of Diamide-Induced Platelet Activation Changes*. Biophysical Journal 68(1): 364.
- Feldman YD, Zuev YF, Polygalov EA y Fedotov VD (1992). *Time Domain Dielectric Spectroscopy - a New Effective Tool for Physical-Chemistry Investigation*. Colloid and Polymer Science 270(8): 768.

- Fricke H (1925). *A Mathematical Treatment of the Electric Conductivity and Capacity of Disperse Systems II. The Capacity of a Suspension of Conducting Spheroids Surrounded by a Non-Conducting Membrane for a Current of Low Frequency*. Physical Review 26: 678.
- Fricke H (1953). *The Electric Permittivity of a Dilute Suspension of Membrane-Covered Ellipsoids*. Journal of Applied Physics 24: 644.
- Fricke H (1955). *The Complex Conductivity of a Suspension of Stratified Particles of Spherical or Cylindrical Form*. Journal of Physical Chemistry 59: 168.
- Fuhr G, Arnold WM, Hagedorn R, Muller T, Benecke W, Wagner B y Zimmermann U (1992). *Levitation, Holding, and Rotation of Cells within Traps Made by High-Frequency Fields*. Biochimica Et Biophysica Acta 1108(2): 215.
- Gascoyne P, Pethig R, Satayavivad J, Becker FF y Ruchirawat M (1997). *Dielectrophoretic Detection of Changes in Erythrocyte Membranes Following Malarial Infection*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1323(2): 240.
- Gascoyne PRC, Becker FF y Wang XB (1995). *Numerical-Analysis of the Influence of Experimental Conditions on the Accuracy of Dielectric Parameters Derived from Electrorotation Measurements*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 36(2): 115.
- Gascoyne PRC, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J y Becker FF (1992). *Dielectrophoretic Separation of Mammalian-Cells Studied by Computerized Image-Analysis*. Measurement Science & Technology 3(5): 439.
- Gascoyne PRC, Pethig R, Burt JPH y Becker FF (1993). *Membrane-Changes Accompanying the Induced-Differentiation of Friend Murine Erythroleukemia-Cells Studied by Dielectrophoresis*. Biochimica Et Biophysica Acta 1149(1): 119.
- Germishuizen WA, Walti C, Wirtz R, Johnston MB, Pepper M, Davies AG y Middelberg APJ (2003). *Selective Dielectrophoretic Manipulation of Surface-Immobilized DNA Molecules*. Nanotechnology 14(8): 896.
- Gheorghiu E (1996). *Measuring Living Cells Using Dielectric Spectroscopy*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 40(2): 133.
- Gimsa J (2001). *A Comprehensive Approach to Electro-Orientation, Electrodeformation, Dielectrophoresis, and Electrorotation of Ellipsoidal Particles and Biological Cells*. Bioelectrochemistry 54(1): 23.
- Gimsa J, Marszalek P, Loewe U y Tsong TY (1991). *Dielectrophoresis and Electrorotation of Neurospora Slime and Murine Myeloma Cells*. Biophysical Journal 60(4): 749.
- Gimsa J y Wachner D (1998). *A Unified Resistor-Capacitor Model for Impedance, Dielectrophoresis, Electrorotation, and Induced Transmembrane Potential*. Biophysical Journal 75(2): 1107.
- Gimsa J y Wachner D (1999). *A Polarization Model Overcoming the Geometric Restrictions of the Laplace Solution for Spheroidal Cells: Obtaining New Equations for Field-Induced Forces and Transmembrane Potential*. Biophysical Journal 77(3): 1316.

- Goater AD, Burt JPH y Pethig R (1997). *A Combined Travelling Wave Dielectrophoresis and Electrorotation Device: Applied to the Concentration and Viability Determination of Cryptosporidium*. Journal of Physics D-Applied Physics 30(18): L65.
- Goater AD y Pethig R (1998). *Electrorotation and Dielectrophoresis*. Parasitology 117: S177.
- Green NG, Morgan H y Milner JJ (1997a). *Dielectrophoresis of Tobacco Mosaic Virus*. Biophysical Journal 72(2): 448.
- Green NG, Morgan H y Milner JJ (1997b). *Manipulation and Trapping of Sub-Micron Bioparticles Using Dielectrophoresis*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 35(2): 89.
- Green NG, Ramos A, Gonzalez A, Morgan H y Castellanos A (2002). *Fluid Flow Induced by Nonuniform Ac Electric Fields in Electrolytes on Microelectrodes. Iii. Observation of Streamlines and Numerical Simulation*. Physical Review E 66(2).
- Green NG, Ramos A y Morgan H (2000). *Ac Electrokinetics: A Survey of Sub-Micrometre Particle Dynamics*. Journal of Physics D-Applied Physics 33(6): 632.
- Green NG, Ramos A, Morgan H y Castellanos A (1999). *Sub-Micrometre Ac Electrokinetics: Particle Dynamics under the Influence of Dielectrophoresis and Electrohydrodynamics*. Electrostatics 163: 89.
- Griffith AW y Cooper JM (1998). *Single-Cell Measurements of Human Neutrophil Activation Using Electrorotation*. Analytical Chemistry 70(13): 2607.
- Höber R (1912). *Ein Sweites Verfahren Die Leitfähigkeit Im Innern Von Zellen Zu Messen*. Pflügers Arch. ges. Physiol. 148: 189.
- Holzel R (1997). *Electrorotation of Single Yeast Cells at Frequencies between 100 Hz and 1.6 GHz*. Biophysical Journal 73(2): 1103.
- Holzel R (1999). *Non-Invasive Determination of Bacterial Single Cell Properties by Electrorotation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research 1450(1): 53.
- Holzel R (2002). *Single Particle Characterization and Manipulation by Opposite Field Dielectrophoresis*. Journal of Electrostatics 56(4): 435.
- Huang Y, Holzel R, Pethig R y Wang X-B (1992). *Differences in the Ac Electrodynamics of Viable and Non-Viable Yeast Cells Determined through Combined Dielectrophoresis and Electrorotation Studies*. Physics in Medicine and Biology 37(7): 1499.
- Huang Y, Wang XB, Becker FF y Gascoyne PRC (1996). *Membrane Changes Associated with the Temperature-Sensitive P85(Gag-Mos)-Dependent Transformation of Rat Kidney Cells as Determined by Dielectrophoresis and Electrorotation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1282(1): 76.
- Huang Y, Wang XB, Holzel R, Becker FF y Gascoyne PRC (1995). *Electrorotational Studies of the Cytoplasmic Dielectric-Properties of Friend Murine Erythroleukemia-Cells*. Physics in Medicine and Biology 40(11): 1789.

- Huang Y, Wang XB, Tame JA y Pethig R (1993). *Electrokinetic Behavior of Colloidal Particles in Traveling Electric-Fields - Studies Using Yeast-Cells*. Journal of Physics D-Applied Physics 26(9): 1528.
- Huang Y, Yang J, Wang X-B, Becker FF y Gascoyne PRC (1999). *The Removal of Human Breast Cancer Cells from Hematopoietic Cd34+ Stem Cells by Dielectrophoretic Field-Flow-Fractionation*. Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research 8(5): 481.
- Hughes MP, Morgan H y Rixon FJ (2001). *Dielectrophoretic Manipulation and Characterization of Herpes Simplex Virus-1 Capsids*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters 30(4): 268.
- Hughes MP, Morgan H y Rixon FJ (2002). *Measuring the Dielectric Properties of Herpes Simplex Virus Type 1 Virions with Dielectrophoresis*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1571(1): 1.
- Hughes MP, Morgan H, Rixon FJ, Burt JPH y Pethig R (1998). *Manipulation of Herpes Simplex Virus Type 1 by Dielectrophoresis*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1425(1): 119.
- Hughes MP, Pethig R y Wang XB (1996). *Dielectrophoretic Forces on Particles in Travelling Electric Fields*. Journal of Physics D-Applied Physics 29(2): 474.
- Iglesias FJ, Lopez C, Santamaria C y Domínguez A (1984). *Dielectrophoretic Properties of Yeast-Cells Dividing by Budding and by Transversal Fission*. Biochimica Et Biophysica Acta 804(2): 221.
- Ikeda I, Tsukahara S y Watarai H (2003). *Effects of Viability and Lectin Protein Binding on Dielectrophoretic Behavior of Single Yeast Cells*. Analytical Sciences 19 (1).
- Irimajiri A, Hanai T y Inouye A (1979). *Dielectric Theory of Multi-Stratified Shell-Model with Its Application to a Lymphoma Cell*. Journal of Theoretical Biology 78(2): 251.
- Johari J, Hubner Y, Hull JC, Dale JW y Hughes MP (2003). *Dielectrophoretic Assay of Bacterial Resistance to Antibiotics*. Physics in Medicine and Biology 48(14): 193.
- Kaler KVIS, Jones TB y Paul R (1995). *Low-Frequency Micromotions of Dep-Levitated Plant-Protoplasts .1.* Journal of Colloid and Interface Science 175(1): 108.
- Kang KH, Kang YJ, Xuan XC y Li DQ (2006). *Continuous Separation of Microparticles by Size with Direct Current-Dielectrophoresis*. Electrophoresis 27(3): 694.
- Labeed FH, Coley HM y Hughes MP (2006). *Differences in the Biophysical Properties of Membrane and Cytoplasm of Apoptotic Cells Revealed Using Dielectrophoresis*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1760(6): 922.
- Labeed FH, Coley HM, Thomas H y Hughes MP (2003). *Assessment of Multidrug Resistance Reversal Using Dielectrophoresis and Flow Cytometry*. Biophysical Journal 85(3): 2028.

- Labeed FH, Chin S, Broche LM, Coley HM, Thomas H y Hughes M (2005). *Rapid Assessment of Biophysical Changes in K562 Cells During Apoptosis, Determined Using Dielectrophoresis*. Biophysical Journal 88(1): 565A.
- Markx GH, Huang Y, Zhou XF y Pethig R (1994). *Dielectrophoretic Characterization and Separation of Microorganisms*. Microbiology-Uk 140: 585.
- Markx GH, Pethig R y Rousselet J (1997a). *The Dielectrophoretic Levitation of Latex Beads, with Reference to Field-Flow Fractionation*. Journal of Physics D-Applied Physics 30(17): 2470.
- Markx GH, Rousselet J y Pethig R (1997b). *Dep-fff: Field-Flow Fractionation Using Non-Uniform Electric Fields*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 20(16-17): 2857.
- Morgan H y Green NG (1997). *Dielectrophoretic Manipulation of Rod-Shaped Viral Particles*. Journal of Electrostatics 42(3): 279.
- Morgan H, Green NG, Hughes MP, Monaghan W y Tan TC (1997). *Large-Area Travelling-Wave Dielectrophoresis Particle Separator*. Journal of Micromechanics and Microengineering 7(2): 65.
- Morgan H, Izquierdo AG, Bakewell D, Green NG y Ramos A (2001). *The Dielectrophoretic and Travelling Wave Forces Generated by Interdigitated Electrode Arrays: Analytical Solution Using Fourier Series*. Journal of Physics D-Applied Physics 34(10): 1553.
- Nedelcu S y Watson JHP (2004). *Size Separation of DNA Molecules by Pulsed Electric Field Dielectrophoresis*. Journal of Physics D-Applied Physics 37(15): 2197.
- Nishikawa A, Tsukahara S y Fujiwara T (2005). *Microscopic Dielectrophoresis of Single DNA in the Presence of Some Substances in Aqueous Solutions*. Bunseki Kagaku 54(6): 459.
- Osterhout WJV (1922). *Injury, Recovery and Death in Relation to Conductivity and Permeability*, Lippincott, Philadelphia.
- Papagiakoumou E, Pietreanu D, Makropoulou MI, Kovacs E y Serafetinides AA (2006). *Evaluation of Trapping Efficiency of Optical Tweezers by Dielectrophoresis*. Journal of Biomedical Optics 11(1): 014035.
- Pastushenko VP, Kuzjmin PI y Chizmadzhev YA (1985). *Dielectrophoresis and Electroration - a Unified Theory of Spherically Symmetrical Cells*. Studia Biophysica 110(1-3): 51.
- Pethig R, Bressler V, Carswell-Crumpton C, Chen Y, Foster-Haje L, Garcia-Ojeda ME, Lee RS, Lock GM, Talary MS y Tate KM (2002). *Dielectrophoretic Studies of the Activation of Human T Lymphocytes Using a Newly Developed Cell Profiling System*. Electrophoresis 23(13): 2057.
- Pethig R y Markx GH (1997). *Applications of Dielectrophoresis in Biotechnology*. Trends in Biotechnology 15(10): 426.
- Phillippson M (1921). *Les Lois De La Resistance Electrique Des Tissus Vivants*. Bull. Acad. roy. Belgique Cl. Sci. 7: 387.

- Pohl HA (1951). *The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields*. Journal of Applied Physics 22: 869.
- Pohl HA (1978). *Dielectrophoresis the Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields*, Cambridge.
- Pohl HA y Crane JS (1971). *Dielectrophoresis of Cells*. Biophysical Journal 11(9): 711.
- Pohl HA y Hawk I (1966). *Separation of Living and Dead Cells by Dielectrophoresis*. Science 152(3722): 647.
- Price JAR, Burt JPH y Pethig R (1988). *Applications of a New Optical Technique for Measuring the Dielectrophoretic Behaviour of Micro-Organisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 964(2): 221.
- Ramos A, Morgan A, Green NG y Castellanos A (1998). *Ac Electrokinetics: A Review of Forces in Microelectrode Structures*. Journal of Physics D-Applied Physics 31: 2338.
- Ramos A, Morgan H, Green NG y Castellanos A (1999). *The Role of Electrohydrodynamic Forces in the Dielectrophoretic Manipulation and Separation of Particles*. Journal of Electrostatics 47(1-2): 71.
- Ratanachoo K, Gascoyne PRC y Ruchirawat M (2002). *Detection of Cellular Responses to Toxicants by Dielectrophoresis*. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes 1564(2): 449.
- Reuss R, Horbaschek M, Endter JM, Zimmermann U y Sukhorukov VL (2004). *The Effect of Disaccharides on the Transport of Lipophilic Ions in Cell Membranes Studied by Electroration*. Electrostatics 2003(178): 101.
- Rogers CG, Cole KS (1925). *Heat Production by Eggs of Arbacia Punctulata during Fertilization and Early Cleavage*. Biological Bulletin 49: 338-353
- Schwan HP (1957). *Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions*. Academic Press, New York.
- Suehiro J, Hamada R, Noutomi D, Shutou M y Hara M (2003). *Selective Detection of Viable Bacteria Using Dielectrophoretic Impedance Measurement Method*. Journal of Electrostatics 57(2): 157.
- Takashima S (1989). *Electrical Properties of Biopolymers and Membranes*. IOP Publishing Ltd., Philadelphia.
- Talary MS, Burt JPH, Tame JA y Pethig R (1996). *Electromanipulation and Separation of Cells Using Travelling Electric Fields*. Journal of Physics D-Applied Physics 29(8): 2198.
- Tuukkanen S, Kuzyk A, Toppari JJ, Hytonen VP, Ihalainen T y Torma P (2005). *Dielectrophoresis of Nanoscale Double-Stranded DNA and Humidity Effects on Its Electrical Conductivity*. Applied Physics Letters 87(18).
- Wang XB, Huang Y, Burt JPH, Markx GH y Pethig R (1993a). *Selective Dielectrophoretic Confinement of Bioparticles in Potential-Energy Wells*. Journal of Physics D-Applied Physics 26(8): 1278.

- Wang XB, Huang Y, Gascoyne PRC, Becker FF, Holzel R y Pethig R (1994). *Changes in Friend Murine Erythroleukemia Cell-Membranes During Induced-Differentiation Determined by Electrorotation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1193(2): 330.
- Wang XB, Huang Y, Holzel R, Burt JPH y Pethig R (1993b). *Theoretical and Experimental Investigations of the Interdependence of the Dielectric, Dielectrophoretic and Electrorotational Behaviour of Colloidal Particles*. Journal of Physics D: Applied Physics 26(2): 312.
- Wang XB, Vykoukal J, Becker FF y Gascoyne PRC (1998). *Separation of Polystyrene Microbeads Using Dielectrophoretic/Gravitational Field-Flow-Fractionation*. Biophysical Journal 74(5): 2689.
- Washizu M (1990). *Electrostatic Manipulation of Biological Objects*. Journal of Electrostatics 25(1): 109.
- Washizu M, Nanba T y Masuda S (1990). *Handling Biological Cells Using a Fluid Integrated-Circuit*. IEEE Transactions on Industry Applications 26(2): 352.
- Washizu M, Suzuki S, Kurosawa O, Nishizaka T y Shinohara T (1994). *Molecular Dielectrophoresis of Biopolymers*. IEEE Transactions on Industry Applications 30(4): 835.
- Yamamoto T, Kurosawa O, Kabata H, Shimamoto N y Washizu M (2000). *Molecular Surgery of DNA Based on Electrostatic Micromanipulation*. IEEE Transactions on Industry Applications 36(4): 1010.
- Yang J, Huang Y, Wang XB, Becker FF y Gascoyne PRC (1999a). *Cell Separation on Microfabricated Electrodes Using Dielectrophoretic/Gravitational Field Flow Fractionation*. Analytical Chemistry 71(5): 911.
- Yang J, Huang Y, Wang XJ, Wang XB, Becker FF y Gascoyne PRC (1999b). *Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion*. Biophysical Journal 76(6): 3307.
- Zheng LF, Brody JP y Burke PJ (2004). *Electronic Manipulation of DNA, Proteins, and Nanoparticles for Potential Circuit Assembly*. Biosensors & Bioelectronics 20(3): 606.
- Zhou XF, Markx GH y Pethig R (1996). *Effect of Biocide Concentration on Electrorotation Spectra of Yeast Cells*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1281(1): 60.
- Zimmermann U y Vienken J (1982). *Electric Field-Induced Cell-to-Cell Fusion*. Journal of Membrane Biology 67(3): 165.

Capítulo 2

ESTUDIO Y DISEÑO NUMÉRICO DE MICROELECTRODOS PARA APLICACIONES ELECTROKINÉTICAS

La introducción de la litografía en la microelectrónica para la fabricación de electrodos ha sido un paso fundamental e indispensable en la mejora y el desarrollo de las aplicaciones de las técnicas electrocinéticas dentro de los múltiples campos en que están implicadas partículas de escalas micro y nanométrica. Las posibilidades que ofrecen estos dispositivos para la manipulación, clasificación, retención o análisis de partículas se ven potenciadas por el respaldo de las simulaciones numéricas. A través de ellas es posible conocer bajo qué condiciones—dimensiones de la cámara, espaciado entre los electrodos, anchura de los electrodos, etc— cualquiera de las aplicaciones anteriores presentará resultados óptimos, reduciendo además así el coste de producción. Basada en una variante de la técnica de los elementos de contorno (BEM), en este capítulo se presenta un estudio numérico de diversas configuraciones de electrodos, incluyendo algunas de sus características previamente no consideradas—como la influencia de las dimensiones de la cámara o de la conductividad del medio, o el recubrimiento dieléctrico de los electrodos—, mediante el cual se puede conocer el patrón dielectroforético más adecuado para nuestro objetivo, la caracterización dieléctrica de células biológicas.

2.1. INTRODUCCIÓN

La actual tendencia a la miniaturización de los dispositivos de experimentación electrocinética, que forman parte de los sistemas de microelectromecánica –conocidos por su acrónimo en inglés, MEMS– ha permitido, por un lado, reducir los efectos secundarios que acompañaban los primeros estadios de la dielectroforesis (Green *et al.* 2000) y, por otro, la integración de todos los dispositivos necesarios en lo que se conoce como ‘laboratorio en un chip’ (Pethig *et al.* 1998) –cuyo extendido término en inglés es ‘*lab-on-a-chip*’–. Esta plataforma biotecnológica resulta de gran utilidad en la elaboración de microcámaras de medición y presenta un creciente interés en la investigación biomédica. Pero a pesar de la expectación generada por estas técnicas, a día de hoy las aproximaciones disponibles para la obtención de la distribución del campo eléctrico presentan todavía ciertas limitaciones debido a las simplificaciones introducidas para la resolución del problema o la no inclusión de determinadas características.

Para la colección de partículas, el dispositivo DEP más empleado consiste en un conjunto de electrodos planos, paralelos e interdigitados, como se muestra en la Figura 2.1. Entre ellos se aplica una diferencia de potencial que genera el campo eléctrico no uniforme –dependiente de las dimensiones de los electrodos y de las propiedades del material– y que provoca el movimiento de las partículas suspendidas en el fluido hacia las regiones de alta o baja intensidad de campo. De esta manera, para encontrar el patrón electrocinético más adecuado se requiere el cálculo previo del gradiente de campo eléctrico creado por una configuración determinada de los electrodos.

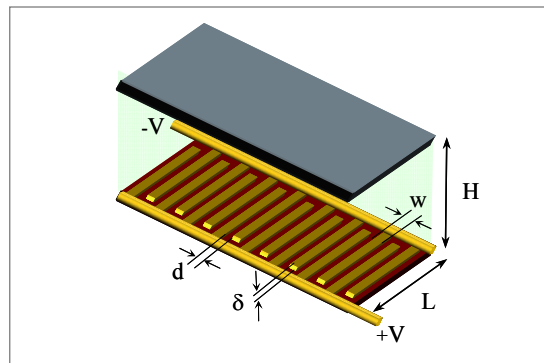


Figura 2.1. Esquema de la cámara dielectroforética con bandas interdigitadas sobre un sustrato situado en la parte inferior. Tanto ésta como la superficie superior son aislantes. Las variables geométricas consideradas son la altura de la cámara (H), su longitud (L), el ancho de los electrodos (w), la separación entre electrodos (d), y el espesor de los mismos (δ).

El promedio de la fuerza dielectroforética que actúa sobre una partícula bajo un campo eléctrico alterno es proporcional al gradiente del cuadrado del campo eléctrico generado por los electrodos según la expresión (Jones 1995):

$$\langle \mathbf{F}_{\text{DEP}} \rangle = \frac{1}{2} \alpha_{ef} \nabla E^2 \quad (2.1)$$

donde α_{ef} es la polarizabilidad efectiva de la partícula y E el valor cuadrático medio del campo eléctrico. Como se introdujo en el primer capítulo, la polarizabilidad es un parámetro característico de cada partícula que describe su comportamiento eléctrico a través de las propiedades interfaciales de aquella y de la frecuencia del campo, según la ecuación (1.36).

Las aproximaciones empleadas hasta el momento para la evaluación de la intensidad de la fuerza DEP generada por determinadas configuraciones de electrodos se basan en métodos analíticos y numéricos. Algunos estudios presentan el cálculo analítico del potencial, del gradiente del campo eléctrico y de la fuerza DEP en un conjunto de electrodos similar al presentado en la figura 2.1, en base a desarrollo en series de Fourier (Morgan *et al.* 2001), o funciones de Green (Wang *et al.* 1996). Otros, combinan técnicas analíticas y numéricas empleando normalmente software comercial no específico –usando métodos de diferencias finitas (FDM) y de elementos finitos (FEM)– y simplifican las condiciones de contorno al considerar la variación lineal del voltaje entre los electrodos adyacentes, y los electrodos de espesor despreciable (Ramos *et al.* 1998; Green *et al.* 2002; Frenea *et al.* 2003; Castellarnau *et al.* 2006). Aún en las ocasiones en las que se emplean las condiciones de contorno mixtas de Dirichlet y Neumann, más próximas a la geometría real de los electrodos, todas estas soluciones presentan algunos inconvenientes debido no sólo a la idealización de la cámara –al desestimar, por ejemplo, el espesor de los electrodos–, a la introducción de errores a causa de la discretización de la geometría o a costosos cálculos computacionales, sino también debido a la omisión en el análisis de otros factores influyentes en el comportamiento del dispositivo. Por ello, una de las pretensiones del actual estudio es facilitar el cálculo del patrón dielectroforético evitando la incursión en la diferenciación numérica de los métodos de diferencias finitas, y posibilitando una aproximación mayor a la realidad del problema sin la necesidad de aumentar los recursos computacionales. Así, la herramienta más adecuada para abordar el problema es una versión especial del método de elementos de contorno (BEM) que permite el cálculo directo de la fuerza DEP, y que está basado en una aproximación del teorema de Green sobre una geometría con condiciones de contorno mixtas. A través del método se llega a evaluar la distribución del campo eléctrico, pudiendo ser analizados los efectos que sobre el patrón dielectroforético tienen las características antes no consideradas tales como la dimensión de la cámara y el espesor de los electrodos, así como un recubrimiento dieléctrico sobre los mismos que evite la adhesión de las células en su superficie, o la influencia de la conductividad del medio iónico. Además de la configuración de bandas paralelas, se analizarán otras configuraciones típicas –como son los electrodos dentados o de perfil diente-sierra– con algunas variantes, viniendo a demostrar la flexibilidad del método para la simulación de geometrías más complejas con distintas escalas de longitud implicadas, presentando además una gran eficiencia computacional frente a las otras técnicas numéricas empleadas en el campo (Erickson 2005).

2.2. MÉTODO NUMÉRICO

2.2.1. ELECTRODOS DE BANDAS PARALELAS

Partiendo de la configuración típica del dispositivo experimental mostrada en la figura 2.1 –frecuentemente empleada en los experimentos de colección dielectroforética y de onda viajera– se analiza el problema planteado en base a la resolución de la ecuación de Laplace en aproximación cuasiestática, ya que las dimensiones de los electrodos son mucho menores que la longitud de onda del campo a las frecuencias normalmente empleadas en los experimentos electrocinéticos. En dicho análisis omitimos los efectos de doble capa en la interfase electrodo-electrolito. Estos sucesos están controlados por medio de dos longitudes características del sistema: la longitud de apantallamiento de Debye, λ_D , y la distancia Λ de difusión de iones durante un periodo del campo. En el caso de electrolitos simétricos –en los que la valencia de los iones de carga positiva iguala a la de aquellos de carga negativa– $\lambda_D = \sqrt{\varepsilon D / \sigma}$ y $\Lambda = \sqrt{4D / \omega}$ donde ε y σ son la permitividad y la conductividad del medio, y D es el coeficiente de difusión de iones supuesto igual para ambos. Para los valores típicos de ε , σ y D , y a frecuencias superiores a unos 50 kHz, tales longitudes son mucho menores que la dimensión más pequeña de los electrodos y la impedancia de la doble capa sobre los electrodos puede considerarse despreciable (Zhou *et al.* 2006), quedando justificada la exclusión de los efectos de doble capa en la interfase electrodo-electrolito.

El potencial ϕ en un punto \mathbf{r} en el interior de la cámara de volumen V o sobre cualquiera de sus superficies frontera S , viene dado por (Jackson 1999)

$$\left. \begin{array}{l} \Omega / 2 \\ \Omega \end{array} \right\} \phi(\mathbf{r}) = \int_S G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \frac{\partial \phi}{\partial n'}(\mathbf{r}') dS' - \int_S \phi \frac{\partial}{\partial n'} G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') dS', \quad \left\{ \begin{array}{l} \mathbf{r} \in S \\ \mathbf{r} \in V \end{array} \right. \quad (2.2)$$

donde G es la función de Green, siendo $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = 1/|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$, $\Omega = 4\pi$ para una geometría en 3D, y $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = -\ln |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$, $\Omega = 2\pi$ para una geometría en 2D (con simetría traslacional).

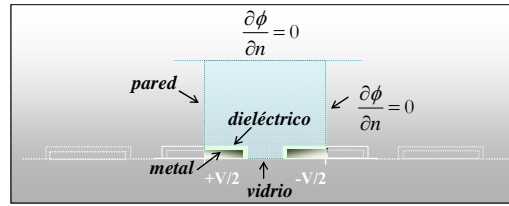


Figura 2.2. Corte transversal del conjunto de electrodos de bandas paralelas, en el que se muestra la celda base con las condiciones de contorno mixtas Dirichlet-Neumann aplicadas, indicando además los distintos materiales simulados.

Considerando que los microelectrodos están dispuestos en la parte inferior de la cámara paralelepípeda limitada por paredes aislantes de vidrio, las condiciones de contorno aplicadas para la resolución del

problema aparecen representadas en la Figura 2.2, donde se muestra la sección vertical que cubre desde el centro de un electrodo al centro del electrodo contiguo y que llamaremos celda base.

Sobre los electrodos se fija el potencial aplicado y en la interfase electrolito-vidrio la componente normal de la corriente total –contribuciones de la corriente de conducción y la de desplazamiento– debe ser continua, es decir,

$$(\sigma_v + i\omega\epsilon_v)\mathbf{E}_v \cdot \mathbf{n} = (\sigma_{ext} + i\omega\epsilon_{ext})\mathbf{E}_{ext} \cdot \mathbf{n} \quad (2.3)$$

en la que los subíndices ‘ v ’ y ‘ ext ’ se refieren al vidrio y al medio fluido externo respectivamente, en contacto en la interfase, y \mathbf{n} es el vector unitario normal a la superficie en cada caso. Dado que los valores de la permitividad y la conductividad del electrolito –normalmente una suspensión acuosa con $\epsilon = 80\epsilon_0$ y $\sigma = 10^{-4}$ S/m– son mucho mayores que los correspondientes para el vidrio aislante – $\epsilon = 4.5\epsilon_0$ y $\sigma = 10^{-12}$ S/m– puede aplicarse en las interfases del vidrio la condición de Neumann, $\partial\phi/\partial n = 0$, que refleja la ausencia de corrientes de conducción a través de ella. Tanto en ésta como en el resto de las configuraciones a analizar, sobre los planos verticales laterales de la celda base se aplica la condición de contorno de Neumann, lo que equivale a suponer periodicidad de comportamiento en esta dirección. Con el objetivo de considerar el recubrimiento de los electrodos en el modelo, se ha incluido una capa dieléctrica en la superficie de los electrodos, como se indica en la figura 2.2. A partir de las condiciones mixtas especificadas se obtendrá una solución única en un punto cualquiera del interior de la cámara.

Al aplicar la ecuación (2.2) sobre las fronteras indicadas en la Figura 2.3, la celda base descrita, se obtienen las siguientes ecuaciones (Martínez y Sancho 1983; Martínez y Sancho 1991)

$$\phi(\mathbf{r}) = -\frac{1}{\pi} \int_{P+D} \phi(\mathbf{r}') \frac{\partial}{\partial n'} (-\log R) dl' + \frac{1}{\pi} \int_D (-\log R) \frac{\partial \phi(\mathbf{r}')}{\partial n'} dl' \quad (2.4)$$

con $\mathbf{r} \in P+D$, y

$$\begin{aligned} \phi(\mathbf{r}) = & \frac{1}{\pi} \int_{M+V+D} \phi(\mathbf{r}') \frac{\partial}{\partial n'} (-\log R) dl' - \frac{1}{\pi} \int_M (-\log R) \frac{\partial \phi(\mathbf{r}')}{\partial n'} dl' \\ & - \frac{1}{\pi k} \int_D (-\log R) \frac{\partial \phi(\mathbf{r}')}{\partial n'} dl', \end{aligned} \quad (2.5)$$

siendo ahora $\mathbf{r} \in M+V+D$. $R = |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$ y las superficies referidas como P , D , M y V representan respectivamente las interfases pared-electrolito, capa dieléctrica-electrolito, metal-dieléctrico y substrato vidrio-dieléctrico. La normal está dirigida hacia el exterior de los contornos indicados en la



Figura 2.3. Detalles de los contornos para la resolución de las ecuaciones (2.4) y (2.5)

Figura 2.3. El factor k es la permitividad relativa del recubrimiento dieléctrico respecto a la del medio de suspensión, $k = \epsilon_i / \epsilon_s$, que es un número complejo cuando los medios empleados son conductores. En el caso de que no exista recubrimiento se aplica únicamente la ecuación (2.4), substituyendo la integración a la interfase dieléctrico por la correspondiente a los electrodos metálicos.

Con el fin de resolver las ecuaciones integrales de Fredholm, expresadas en (2.4) y (2.5), se ha empleado una aproximación del método BEM, dividiendo cada interfase en segmentos lineales, y empleando un mallado más fino en las proximidades de las esquinas donde se espera que los campos varíen de forma más rápida. Las ecuaciones se reducen a un conjunto de ecuaciones algebraicas en las que los potenciales en las interfases del vidrio-dieléctrico y los campos normales a los electrodos son las incógnitas. Los coeficientes son calculados fácilmente considerando su significado físico: el potencial y la componente normal del campo eléctrico generados por la unidad de densidad de carga que, uniformemente distribuida sobre el segmento j , produce sobre el centro del segmento i , según aparece en el dibujo esquemático de la Figura 2.4.

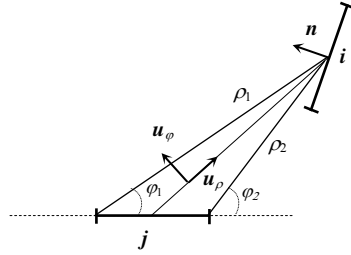


Figura 2.4. Esquema explicativo para la obtención de los coeficientes de las ecuaciones de Fredholm: la densidad de carga unidad distribuida uniformemente en el segmento considerado, j , genera un campo determinado sobre el punto medio del segmento i .

Estos coeficientes tienen una expresión analítica simple que, en coordenadas cilíndricas ρ y φ dada la simetría del problema, vienen dadas por las ecuaciones (Durand 1953)

$$A_{ij} = -\frac{1}{\pi} \int \log R \, dl' = \frac{1}{2\pi} \log \left[\frac{\operatorname{tg}(\rho_1/2)}{\operatorname{tg}(\rho_2/2)} \right] \quad (2.6)$$

$$B_{ij} = -\frac{1}{\pi} \int \frac{\partial}{\partial n'} (\log R) \, dl' = \frac{1}{2\pi} \left[\left[\frac{1}{\rho_2} - \frac{1}{\rho_1} \right] n_\varphi + \left[\frac{1}{\rho_1} \operatorname{tg} \left(\frac{\varphi_1}{2} \right) - \frac{1}{\rho_2} \operatorname{tg} \left(\frac{\varphi_2}{2} \right) \right] n_\rho \right] \quad (2.7)$$

donde $n_\varphi = \mathbf{n} \cdot \mathbf{u}_\varphi$ y $n_\rho = \mathbf{n} \cdot \mathbf{u}_\rho$. Una vez resuelta la ecuación integral y obtenidas las incógnitas en la frontera, puede calcularse el potencial en cualquier punto en el interior del volumen V a partir de la ecuación correspondiente. La aplicación sucesiva de la operación gradiente proporciona el campo y la fuerza dielectroforética en términos de las derivadas de los coeficientes del sistema. De este modo, puede obtenerse la fuerza DEP en punto cualquiera sin necesidad de recurrir a la diferenciación numérica, lo que supone una ventaja frente a la técnica estándar de los elementos de contorno u otras técnicas numéricas.

2.2.2. ELECTRODOS DENTADOS

En base a este desarrollo numérico, podremos analizar otras importantes configuraciones empleadas en la experimentación electrocinética, como son los electrodos dentados, bien siguiendo el perfil almenado o el diente-sierra. La concentración de partículas mediante dielectroforesis se realiza fundamentalmente empleando microelectrodos almenados (Burt *et al.* 1989; Pethig *et al.* 1992; Castellarnau *et al.* 2006; Sebastian *et al.* 2006), ya que la fuerte no uniformidad del campo que generan, junto con el incremento de la longitud del borde de los electrodos –donde tiene lugar principalmente la colección de partículas– hacen que esta configuración sea especialmente indicada para tal fin. Para este tipo de estructura se ha observado el comportamiento de los electrodos según dos disposiciones distintas, como se muestra en la Figura 2.5(a): la configuración creada por un desplazamiento entre los perfiles dentados enfrentados, y la generada cuando la confrontación se realiza a modo de acople, dejando en ambos casos la misma separación mínima. Asimismo, se han analizado dos configuraciones análogas con perfil diente-sierra, tal y como aparecen en la Figura 2.5(b).

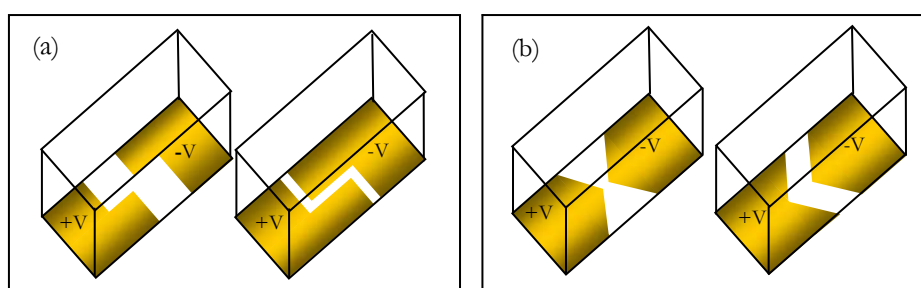


Figura 2.5. Celdas base para el estudio del comportamiento de los microelectrodos con geometrías dentadas: (a) configuraciones almenadas de vértices enfrentados y acoplada, en la izquierda y derecha respectivamente; (b) o perfil diente-sierra, en disposiciones análogas a las anteriores

Recientemente, los microelectrodos de perfil diente-sierra caracterizadas por formas triangulares se han empleado de forma eficiente para la alineación de nanotubos (Tung *et al.* 2007) o trampas para moléculas aisladas mediante dielectroforesis (Holzel *et al.* 2005). Dicha geometría resulta potencialmente indicada para el posicionamiento y la retención de partículas dada la singularidad del campo eléctrico en los vértices. La discretización de estos electrodos se realiza mediante la división de la superficie en pequeños triángulos, aplicando el método general de la misma manera, a partir de la ecuación (2.2) para 3D.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. ELECTRODOS DE BANDAS PARALELAS

La tendencia general de la fuerza dielectroforética creada por los electrodos de bandas paralelas puede observarse en las Figuras 2.6(a) y (b), donde se representa el perfil del módulo de la fuerza DEP en un plano transversal a los electrodos, calculada a distintas alturas por encima del plano de los mismos, aplicando un voltaje de $\pm 10V$. Los máximos de la amplitud del módulo del gradiente de E^2 —que denominaremos fuerza DEP obviando la dependencia frecuencial del factor de Clausius-Mossotti— localizados justo en la vertical tendida desde los bordes internos de los electrodos, disminuyen de manera brusca con la distancia a dicho borde. En ambas figuras se recoge también la influencia de una de las características menos tratadas en trabajos previos sobre el diseño de microelectrodos, como es su espesor δ . A través del estudio, puede observarse que un aumento del espesor provoca un fuerte incremento de la fuerza dielectroforética especialmente en las proximidades de los electrodos.

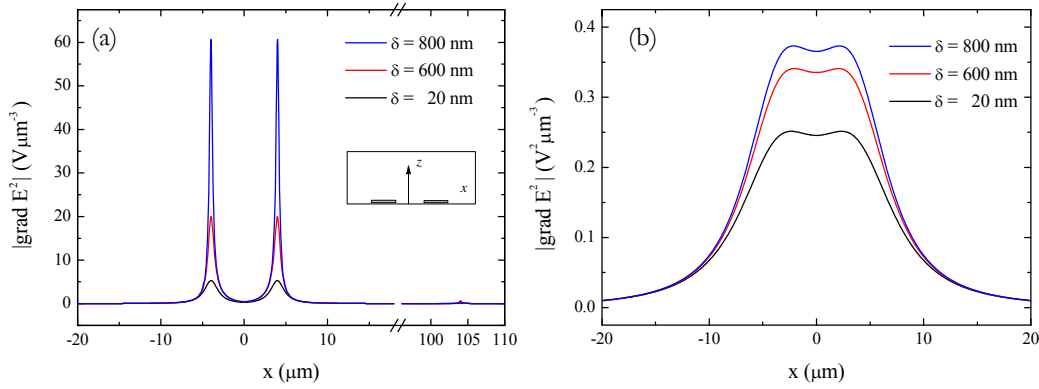


Figura 2.6. Perfil del módulo de la fuerza DEP (a) calculada a una altura $z = 1\mu\text{m}$ sobre los electrodos, o (b) $z = 5\mu\text{m}$. Las dimensiones de la cámara son $600\mu\text{m} \times 120\mu\text{m}$, con electrodos separados una distancia $d = 8\mu\text{m}$, con un ancho $w = 100\mu\text{m}$ y considerando distintos espesores.

En base a este simple análisis, se concluye el importante papel del espesor de los electrodos en los experimentos DEP para la retención de moléculas o células sobre su superficie, en los que la fuerza dielectroforética tiene que competir con las fuerzas de difusión o cizallamiento del flujo en las proximidades de los electrodos. Del mismo modo, este factor puede ser relevante en experimentos orientados a la separación de partículas, como los de fraccionamiento de flujo de campo dielectroforético.

Por otro lado, como se vio con las leyes de escala en el estudio de la dinámica de partículas en los fenómenos electrocinéticos del capítulo inicial, una de las dimensiones a tener muy en cuenta en los microelectrodos es la separación entre las placas. La Figura 2.7(a) describe la dependencia del

máximo de la fuerza DEP con el tamaño del gap, calculada a una altura $z = 5 \mu\text{m}$: a mayor distancia d de separación entre los electrodos, menor fuerza actuando sobre las partículas. En la misma figura se ha incluido la influencia de la variación del espesor sobre el resultado final de la fuerza DEP.

Finalmente, el estudio se ha completado con la observación de las posibles implicaciones de la altura de la cámara sobre la eficiencia de colección dielectroforética. En base a los perfiles de la fuerza DEP a lo largo del eje vertical z obtenidos para tres alturas diferentes de la cámara, y mostrados en la Figura 2.7(b), se infiere que la condición frontera afecta únicamente a cortas distancias de la zona superior que cierra la cámara, por lo que no es una característica determinante en el diseño de los electrodos con fines de colección de partículas sobre sus superficies, a efectos de la distribución del campo eléctrico.

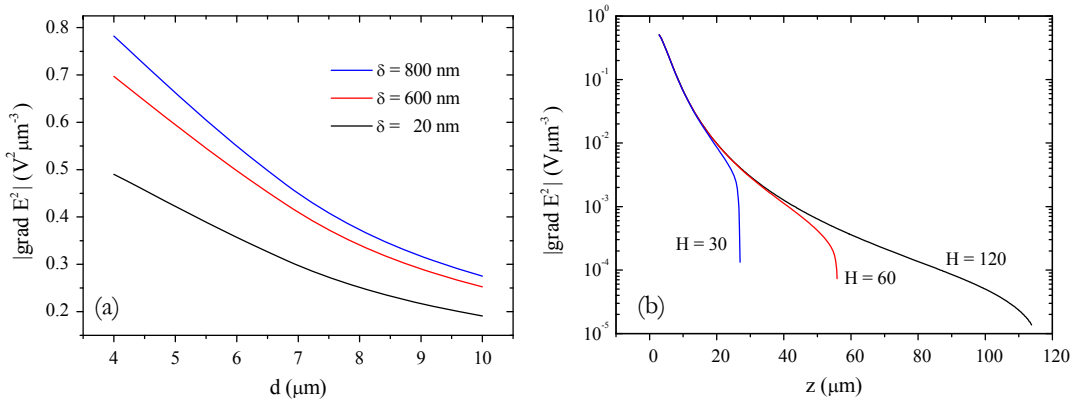


Figura 2.7. (a) Variación de la fuerza DEP máxima con la distancia d entre los electrodos, considerando distintos valores del espesor δ . (b) Efecto de la altura de la cámara sobre la fuerza DEP calculada en el punto medio de la separación entre los electrodos—con un gap $d = 8 \mu\text{m}$ — a lo largo del eje vertical z .

2.3.2. ELECTRODOS DENTADOS: ALMENADOS Y DIENTE SIERRA

Volviendo sobre lo que se dijo anteriormente, los electrodos de formas fuertemente curvadas o extremos abruptos generan altas no uniformidades del campo de las que depende la fuerza DEP, y que los hace especialmente adecuados para la concentración de partículas. A partir del método desarrollado, se ha estudiado el comportamiento de electrodos con configuraciones de tales características, como son los electrodos almenados y los de perfil diente-sierra. Con el fin de evaluar la idoneidad de estas configuraciones para la colección DEP de partículas, se ha establecido un estudio comparativo con los electrodos de bandas paralelas.

Considerando inicialmente los electrodos almenados, se ha calculado el módulo de E^2 — Figuras 2.8(a) y (b)— en un plano xy a una altura de $5 \mu\text{m}$, fijando la distancia mínima entre los electrodos a un valor de $10 \mu\text{m}$. Según resultó del estudio de bandas paralelas, a esta altura el

efecto del espesor de los electrodos sobre la fuerza DEP dejaba de ser determinante. Además, y conforme a lo presentado en la figura 2.4(b), a dicha distancia sobre los electrodos la fuerza se caracteriza por un perfil más suave con una única región favorable para la concentración de partículas, que coincide con el espacio entre los electrodos. Por su parte, los electrodos almenados generan altos gradientes de campo tanto en el espacio entre los vértices del perfil como en las regiones sobre las superficies internas inmediatamente en las proximidades de dichos puntos. Comparando las dos modalidades consideradas, la disposición ensamblada – figura 2.8(b)– de los electrodos llega a generar picos del doble de magnitud que la estructura enfrentada –figura 2.8(a)–, sobre la superficie correspondiente a la zona convexa de la indentación.

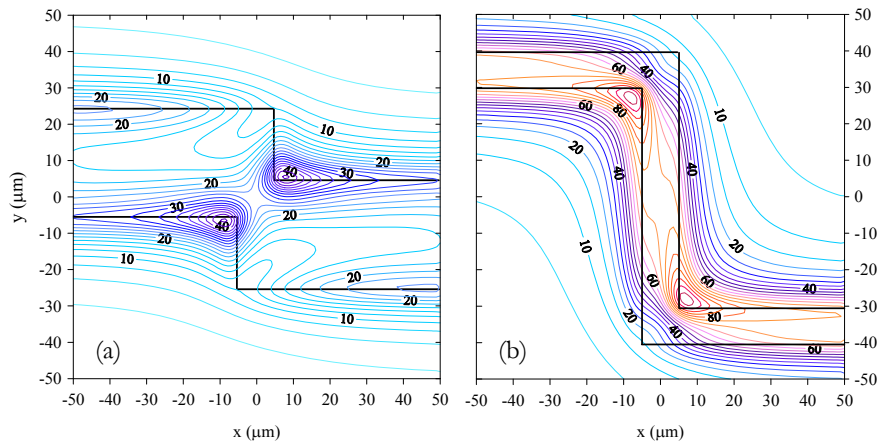


Figura 2.8. Contornos de la magnitud $|\nabla E^2|$ en el plano xy a una altura $z = 5 \mu\text{m}$ de los electrodos almenados (a) enfrentados, y (b) ensamblados. (Por razones de claridad, el módulo del gradiente de E^2 , en $\text{V}^2 \mu\text{m}^{-3}$, se ha multiplicado por el factor 10^2).

A continuación hemos obtenido el perfil de la fuerza DEP generada por las estructuras de bandas paralelas y los perfiles diente-sierra, manteniendo los electrodos separados a una distancia mínima de $10 \mu\text{m}$ en todos los casos. Los resultados, mostrados en las Figuras 2.9(a)-(c), resaltan la evidencia del mayor gradiente de campo en los puntos próximos a los vértices de los electrodos diente-sierra, en comparación con el provocado en los bordes internos de las bandas paralelas. Según la figura 2.9(b), la configuración de vértices enfrentados provoca una fuerte concentración de las líneas de campo en el espacio entre los dos electrodos, aunque contrariamente a lo que cabría esperar de forma intuitiva, no es esta la disposición que genera una mayor fuerza DEP. La configuración diente-sierra ensamblada es la que origina el mayor gradiente de campo debido al vértice del electrodo convexo, como se observa en la figura 2.9(c). Además esta última disposición da lugar a una alta asimetría de la distribución de la fuerza en función de la altura, si bien en ambos casos la fuerte concentración cerca de los vértices triangulares decrece muy rápidamente a medida que aumenta la distancia por encima del plano de los electrodos.

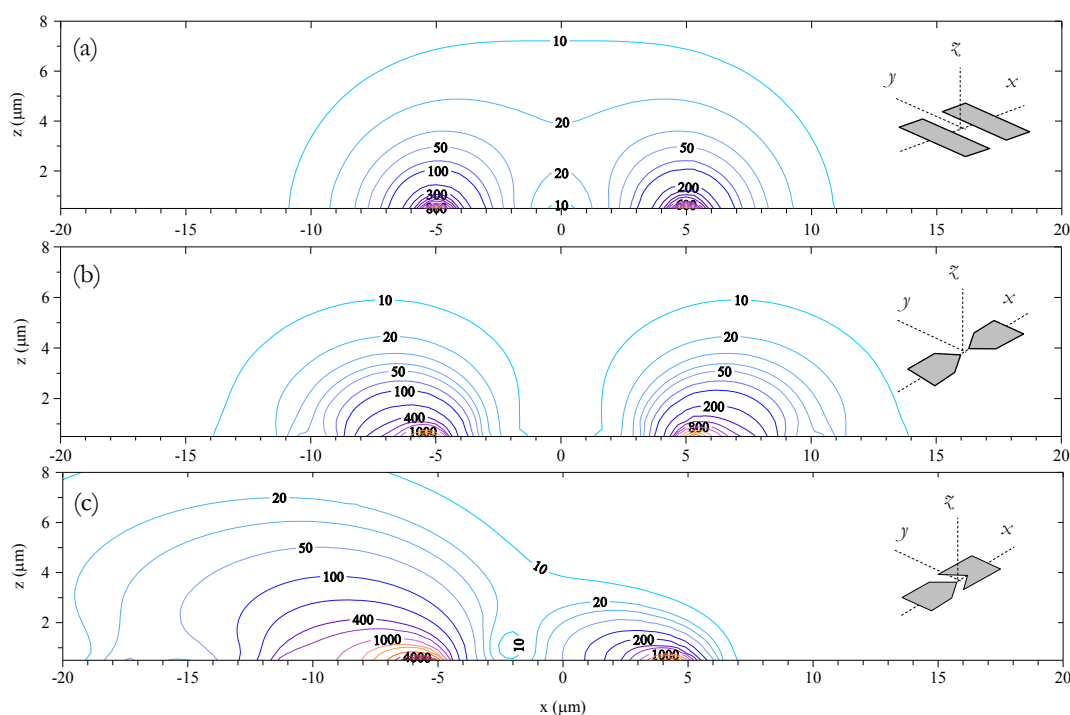
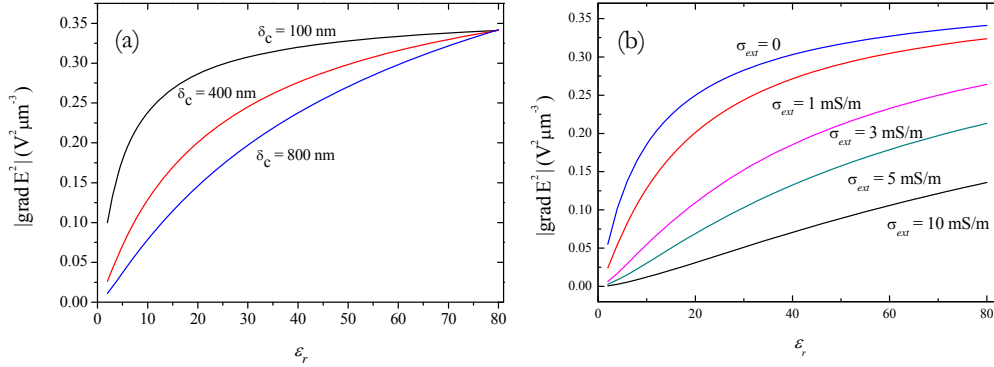


Figura 2.9. Líneas de contorno de la fuerza DEP en el plano $y = 0$ generados en la celda base por los electrodos de configuración (a) bandas paralelas (b) diente-sierra, enfrentados vértice a vértice, y (c) diente-sierra, con vértices acoplados, todos ellos separados en su distancia mínima $10 \mu\text{m}$. (Por razones de claridad, el módulo del gradiente de E^2 , en $\text{V}^2 \mu\text{m}^{-3}$, se ha multiplicado por el factor 10^2).

2.3.3. RECUBRIMIENTO DE ELECTRODOS

Otro aspecto significativo a considerar en el diseño de los electrodos para experimentos DEP es el control de la adhesión celular a la superficie de los electrodos. Este hecho, que ocurre de manera frecuente, puede falsear la cuantificación de las células colectadas sobre los mismos por el fenómeno dielectroforético. Es habitual encontrar trabajos en los que se pretende eliminar la adhesión de determinadas células al dispositivo mediante el recubrimiento de los electrodos con sustancias bioquímicas como la tripsina —enzima secretada en el intestino para la digestión de proteínas—, del mismo modo que se emplea para impedir su adhesión sobre las placas Petri de cultivo celular dentro del dominio biológico. En otras ocasiones se ha recurrido a la modificación química de las superficies de los electrodos, por ejemplo, con el fin de lograr una adhesión selectiva de células en busca de determinados patrones —como sucede en determinados estudios de la actividad y estimulación de células neuronales mediante la creación de redes locales en pozos habilitados al efecto—, o por cuestiones de biocompatibilidad del dispositivo. Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay estudios relativos a las implicaciones del recubrimiento con materiales como el nitrato de

silicio, teflón, etc, sobre la efectividad DEP de los sistemas de microelectrodos. Con tal objetivo, se ha extendido el método BEM propuesto, según la ecuación (2.5) incluyendo la presencia de diferentes medios dieléctricos y conductores, resultando un sistema de ecuaciones integrales aplicables a las fronteras que limitan el recubrimiento dieléctrico y el electrolito, respectivamente.



Figuras 2.10. Dependencia del máximo de la fuerza DEP con la permitividad relativa ϵ_r del material de recubrimiento dieléctrico. (a) Según distintos espesores δ_c de la capa; (b) variando la conductividad σ_{ext} del medio electrolito, para una capa de espesor $\delta_c = 200 \text{ nm}$. La distribución del campo se calcula en un plano a $5 \mu\text{m}$ por encima de los electrodos.

Partiendo del máximo de la fuerza DEP generada por la configuración de electrodos planos paralelos, se ha estudiado el efecto del recubrimiento sobre la distribución del campo dentro de la cámara. En la Figura 2.10(a) se muestran los resultados obtenidos habiendo considerado diversos espesores de la capa, y en función de los valores de la permitividad relativa del dieléctrico, a una altura $z = 5 \mu\text{m}$.

Los materiales aptos para el recubrimiento como el sílice (SiO_2), el nitrato de sílice (Si_3N_4), el poliestireno (PS) o el teflón, que poseen bajos valores de la permitividad relativa ϵ_r —oscilando entre el 2.1 del teflón y el 7 del Si_3N_4 —, producen un fuerte apantallamiento del campo eléctrico, llegando a provocar una importante reducción de la fuerza dielectroforética. En los casos en que la permitividad dieléctrica del recubrimiento se aproxima a la del medio externo—del orden de $80\epsilon_0$ —, la fuerza dielectroforética generada por los electrodos tiende, como es lógico, al caso en que éstos no presentan recubrimiento.

Hay que hacer notar que a pesar de que el recubrimiento dieléctrico se supone sin pérdidas, los resultados—que se muestran en la Figura 2.10(b)— dependen fuertemente de la conductividad del medio para una frecuencia dada. Se considera la estructura aislada con una capa de espesor de 200 nm —suficiente para apantallar el campo sin llegar a anularlo en los casos de menor ϵ_r —, y un campo aplicado a una frecuencia de 100 kHz —a la que poder examinar la influencia de la conductividad—. Según muestra la figura los efectos de los materiales de recubrimiento con valores de permitividad bajos, siguen siendo importantes

hasta en el caso de conductividad nula. Estas capas sobre los electrodos pueden, por tanto, provocar un apantallamiento casi total del campo eléctrico en soluciones acuosas, especialmente en bajas frecuencias, incrementando o disminuyendo su acción en función de factores como el espesor del recubrimiento, el valor de su permitividad o la conductividad del medio externo.

2.4. CONCLUSIONES

Los resultados numéricos presentados en este capítulo demuestran que el método de ecuaciones integrales para la configuración de los electrodos y medios dieléctricos es apropiado para el diseño preciso de los sistemas dielectroforéticos. El método incorpora condiciones de contorno exactas y proporciona un cálculo directo de las fuerzas DEP, evitando cálculos intermedios que pueden acarrear errores no controlables. A través de este estudio se concluye la importancia de la simulación numérica que permita un conocimiento previo de las posibilidades del dispositivo experimental diseñado con un determinado objetivo, favoreciendo además la reducción de los costes de fabricación. Al conocido comportamiento de los máximos del gradiente del campo en el borde interno de los electrodos y su variación con la altura, se ha añadido la influencia sobre dichos máximos del espesor de los electrodos o la altura de la cámara. Además, la flexibilidad del método para el análisis de diversas geometrías ha permitido observar el interesante comportamiento de determinadas configuraciones de electrodos, tales como el perfil diente-sierra en su configuración menos común, enfrentando vértices cóncavos y convexos. Finalmente, se ha estudiado el efecto de las capas dieléctricas cubriendo los electrodos, analizando el grado de apantallamiento del campo que provocan en función del valor de la permitividad característica del material de recubrimiento, el espesor de la capa y la conductividad de la solución acuosa. No hay que olvidar, no obstante, que estos últimos resultados se han obtenido a una frecuencia de 100 kHz –por debajo del rango de frecuencias normalmente empleado en la experimentación DEP–, y que a mayores frecuencias los efectos son mínimos en este sentido. De ahí que recubrimientos tales como el nitrato de silicio ejerzan su acción antiadhesiva frente a las células –a la par que aumentan el tiempo de vida útil del dispositivo– sin provocar grandes atenuaciones del gradiente de campo, siempre que su espesor no sobrepase los 200 nm y no se empleen bajas frecuencias. Aunque en nuestro caso la aplicación del método se ha orientado a los dispositivos de electrodos diseñados para la colección de células, mediante la ampliación correspondiente podría analizarse el sistema con vistas a otras importantes aplicaciones en biotecnología.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Burt JPH, Alameen TAK y Pethig R (1989). *An Optical Dielectrophoresis Spectrometer for Low-Frequency Measurements on Colloidal Suspensions*. Journal of Physics E-Scientific Instruments 22(11): 952.
- Castellarnau M, Zine N, Bausells J, Madrid C, Juarez A, Samitier J y Errachid A (2006). *Integrated Microanalytical System Based on Electrochemical Detection and Cell Positioning*. Materials Science and Engineering: C 26(2-3): 405.
- Durand E (1953). *Électrostatique et Magnétostatique*. Massons, Paris.
- Erickson D (2005). *Towards Numerical Prototyping of Labs-on-Chip: Modeling for Integrated Microfluidic Devices*. Microfluidics and Nanofluidics 1(4): 301.
- Frenea M, Faure SP, Le Pioufle B, Coquet y Fujita H (2003). *Positioning Living Cells on a High-Density Electrode Array by Negative Dielectrophoresis*. Materials Science and Engineering-C 23(5): 597.
- Green NG, Ramos A y Morgan H (2000). *Ac Electrokinetics: A Survey of Sub-Micrometre Particle Dynamics*. Journal of Physics D-Applied Physics 33(6): 632.
- Green NG, Ramos A y Morgan H (2002). *Numerical Solution of the Dielectrophoretic and Travelling Wave Forces for Interdigitated Electrode Arrays Using the Finite Element Method*. Journal of Electrostatics 56(2): 235.
- Holzel R, Calander N, Chiragwandi Z, Willander M y Bier FF (2005). *Trapping Single Molecules by Dielectrophoresis*. Physical Review Letters 95(12): 128102.
- Jackson JD (1999). *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons, New York .
- Jones TB (1995). *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martínez G y Sancho M (1983). *Integral Equation Methods in Electrostatics*. American Journal of Physics 51(2): 170.
- Martínez G y Sancho M (1991). *Integral Equation Methods for the Analysis of Electrostatic Potentials and Electron Trajectories*. Advances in electronics and electron physics 81: 1.
- Morgan H, Izquierdo AG, Bakewell D, Green NG y Ramos A (2001). *The Dielectrophoretic and Travelling Wave Forces Generated by Interdigitated Electrode Arrays: Analytical Solution Using Fourier Series*. Journal of Physics D-Applied Physics 34(10): 1553.
- Pethig R, Burt JPH, Parton A, Rizvi N, Talary MS y Tame JA (1998). *Development of Biofactory-on-a-Chip Technology Using Excimer Laser Micromachining*. Journal of Micromechanics and Microengineering 8(2): 57.
- Pethig R, Ying H, Xiao-bo W y Burt JPH (1992). *Positive and Negative Dielectrophoretic Collection of Colloidal Particles Using Interdigitated Castellated Microelectrodes*. Journal of Physics D-Applied Physics 24(5): 881.

- Ramos A, Morgan A, Green NG y Castellanos A (1998). *Ac Electrokinetics: A Review of Forces in Microelectrode Structures*. Journal of Physics D-Applied Physics 31: 2338.
- Sebastian A, Buckle A-M y Markx GH (2006). *Formation of Multilayer Aggregates of Mammalian Cells by Dielectrophoresis*. 9: 1769.
- Tung S, Rokadia H y Li WJ (2007). *A Micro Shear Stress Sensor Based on Laterally Aligned Carbon Nanotubes*. Sensors and Actuators A: Physical 133(2): 431.
- Wang XJ, Wang XB, Becker FF y Gascoyne PRC (1996). *A Theoretical Method of Electrical Field Analysis for Dielectrophoretic Electrode Arrays Using Green's Theorem*. Journal of Physics D-Applied Physics 29(6): 1649.
- Zhou H, Tilton RD y White LR (2006). *The Role of Electrode Impedance and Electrode Geometry in the Design of Microelectrode Systems*. Journal of Colloid and Interface Science 297(2): 819.

Capítulo 3

MODELIZACIÓN DIELECTRICA DE CÉLULAS BIOLÓGICAS

La interacción del campo eléctrico con las partículas biológicas puede ser estudiada, a nivel de descripción celular, en base a determinados parámetros de interés tanto desde el punto de vista del comportamiento eléctrico, como desde el ámbito de la fisiología celular. La distribución del campo en el interior de la célula, su polarización eléctrica, el grado de penetración de la radiación o el potencial transmembrana inducido, son algunos de los parámetros evaluados mediante la simulación del problema con el fin de proceder a la caracterización de la biopartícula, realizar análisis microdosimétricos, prever el comportamiento electrocinético de la célula o establecer los protocolos para los fenómenos de electroporabilización. Para todo ello, el modelo de la célula juega un papel primordial no sólo con el fin de una correcta estimación de las magnitudes implicadas en el estudio, sino también para una precisa interpretación de los datos experimentales y la posterior caracterización de la célula. El recurso a los métodos numéricos es indispensable cuando se pretende optimizar los modelos empleados para la simulación de las partículas, que hasta el momento se encontraban limitados a aquellos que permitían una resolución analítica de la ecuación de Laplace. El método de los elementos de contorno empleado permite modelizar las partículas con una gran aproximación a su geometría, además de adaptar el modelo a las distintas dimensiones implicadas en el problema —como las micras del diámetro celular y los nanómetros del espesor de la membrana—.

3.1. INTRODUCCIÓN

En cualquiera de los ámbitos en que partículas de pequeñas dimensiones se someten a campos eléctricos es importante realizar un análisis de la interacción partícula-campo que proporcione una mayor comprensión de la fenomenología observada. Los métodos empleados para la manipulación, selección, separación y captura de partículas dieléctricas bajo campos eléctricos, se han visto favorecidos por la introducción de la microtecnología para la fabricación de electrodos, potenciando así sus posibilidades. Esto ha provocado un creciente interés por los fenómenos electrocinéticos en todas las industrias en las que se trabaja con partículas micro y hasta nanométricas, pasando desde el ámbito biomédico en el que se encuadra principalmente este estudio, hasta en los sectores electrónico, metalúrgico, mineral, farmacéutico o de la tecnología de los alimentos.

Llevar a cabo la interpretación de los fenómenos electrocinéticos supone, en primer lugar, considerar que la mayor parte de las partículas con las que se trabaja presentan estructuras con una o más capas –bien sea por su naturaleza, como en el caso de las células biológicas, bien por exigencias del proceso de manipulación como ocurre con partículas sintéticas y determinadas biomoléculas–; y en segundo lugar, establecer una relación entre la respuesta en frecuencia observada y un modelo dieléctrico a través del cual se pretende describir la partícula. El análisis de la respuesta de los sistemas heterogéneos bajo una excitación eléctrica comenzó por los casos más simples, suponiendo campos estáticos o medios fluidos sin pérdidas, y en base a la conservación de la energía (Crane y Pohl 1972). Ante la inconveniencia de tal descripción para el tratamiento de partículas con pérdidas, Sauer y Scholgl (Sauer y Schlögl 1985) emplearon el tensor de Maxwell para deducir la expresión de la fuerza y el torque electrocinéticos. Pero la aplicación de tales expresiones a los datos experimentales resulta en ocasiones demasiado complicada o imposible. En base a los modelos multicapa desarrollados por Fricke (Fricke 1925) para la interpretación de experimentos de impedancia dieléctrica, ya en el primer cuarto del pasado siglo, y con la aportación a su teoría dieléctrica de los trabajos posteriores de Hanai (Hanai 1960) e Irimajiri (Irimajiri *et al.* 1979), se han extraído las propiedades eléctricas de células en varios trabajos (Asami *et al.* 1976; 1980; 1989; 1992). Para ello las partículas heterogéneas se describían en términos de una permitividad compleja equivalente, de modo que la partícula pasaba a considerarse homogénea con dicha permitividad. Este método ha supuesto una buena aproximación al problema por medio de soluciones analíticas, proporcionando una herramienta para la evaluación de la impedancia de una suspensión o los efectos dinámicos, en base a determinados parámetros estructurales y eléctricos. Resultados similares se han logrado a través del método del momento dipolar efectivo (Jones 1995; Pastushenko *et al.* 1985) que permite evaluar la fuerza DEP y el torque ER, para una partícula esférica, según las expresiones

$$\tilde{\mathbf{p}}_{ef} = 4\pi\epsilon_{ext} a^3 \left[\tilde{f}_{CM}(\omega) \right] \tilde{\mathbf{E}} \quad (3.1)$$

$$\langle \mathbf{F}_{DEP} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} \left[(\tilde{\mathbf{p}}_{ef} \nabla) \tilde{\mathbf{E}}^* \right] \quad (3.2)$$

$$\langle \mathbf{T}_{\text{ER}} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} [\tilde{\mathbf{p}}_{ef} \times \tilde{\mathbf{E}}^*] \quad (3.3)$$

donde $\tilde{\mathbf{p}}_{ef}$ es el momento dipolar efectivo, ϵ_{ext} la permitividad del medio externo, a el radio de la partícula y \tilde{f}_{CM} el factor de Clausius-Mossotti, función dependiente de la permitividad de la partícula y de la del medio externo. La hipótesis planteada por el método supone que la partícula es un dipolo puntual situado en la misma posición que la partícula original, generando la misma distorsión del campo que aquella. Según las ecuaciones, se deduce que a partir de una correcta evaluación del momento dipolar efectivo $\tilde{\mathbf{p}}_{ef}$ se conseguirá una buena estimación de la fuerza dielectroforética o del torque electrorotacional. Este método se caracteriza por su sencillez, y es aplicable también a los casos de partículas con capas, siempre y cuando se introduzca la magnitud equivalente y compleja –en los casos de partículas con pérdidas– $\tilde{\epsilon}'_p$, para la descripción eléctrica de la partícula de radio a , del tipo,

$$\left(\frac{\tilde{\epsilon}'_p - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}'_p + 2\tilde{\epsilon}_m} \right) = \left(\frac{a}{a + \delta} \right)^3 \left(\frac{\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_i + 2\tilde{\epsilon}_m} \right) \quad (3.4)$$

donde $\tilde{\epsilon}_m$ y $\tilde{\epsilon}_i$ son las permitividades relativas a la capa externa o membrana celular –de espesor δ – y al compartimento interior de la partícula, respectivamente.

3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

Muchas de las biopartículas sometidas a la experimentación electrocinética presentan estructuras más complejas que la membrana encerrando el citoplasma, o geometrías que difieren de la esférica. Hasta el momento, los modelos empleados para el estudio del comportamiento eléctrico de una célula en estos casos son modelos analíticos que proporcionan, en mayor o menor medida, un acercamiento a la comprensión del fenómeno. Las células esféricas multicapa o las células elipsoidales se han venido estudiando a partir de los modelos que se describen a continuación.

3.2.1. MODELOS ESFÉRICOS MULTICAPA

Visto el caso más general de una partícula esférica con una capa, el problema que se plantea con partículas esféricas multicapa, como la mostrada en la Figura 3.1, se resuelve analíticamente de forma similar al caso previo de una sola capa. La aproximación empleada para la descripción eléctrica de estas partículas heterogéneas se corresponde con el modelo llamado ‘*smearred-out*’. Según esta aproximación, dichas partículas quedan descritas eléctricamente por medio de una permitividad compleja equivalente, que es la expresión generalizada de la ecuación (3.4). Supóngase la partícula multicapa de la figura está compuesta por $N+1$ esferas concéntricas de radio R_i , caracterizadas por una permitividad ϵ_i y una conductividad σ_i , donde $i = 1, 2, \dots, N+1$. La permitividad compleja efectiva de la partícula homogénea, representando la partícula multicapa, se obtiene a partir del siguiente desarrollo.

Sea $N = 1$ la esfera más interna de la partícula de modo que la permitividad efectiva $\tilde{\epsilon}_1'$ de ésta y la siguiente capa es

$$\left(\frac{\tilde{\epsilon}_1' - \tilde{\epsilon}_2}{\tilde{\epsilon}_1' + 2\tilde{\epsilon}_2} \right) = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^3 \left(\frac{\tilde{\epsilon}_1 - \tilde{\epsilon}_2}{\tilde{\epsilon}_1 + 2\tilde{\epsilon}_2} \right) \quad (3.5)$$

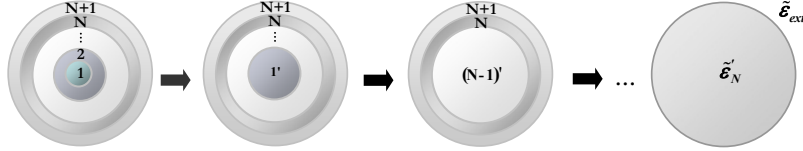


Figura 3.1. Aproximación del modelo *smeared-out* para la determinación de la permitividad efectiva de una partícula esférica multicapa.

Del mismo modo, para la esfera de permitividad efectiva $\tilde{\epsilon}_1'$, y la tercera capa de permitividad $\tilde{\epsilon}_3$, la permitividad compleja equivalente $\tilde{\epsilon}_2'$ será

$$\left(\frac{\tilde{\epsilon}_2' - \tilde{\epsilon}_3}{\tilde{\epsilon}_2' + 2\tilde{\epsilon}_3} \right) = \left(\frac{R_3}{R_2} \right)^3 \left(\frac{\tilde{\epsilon}_1' - \tilde{\epsilon}_2}{\tilde{\epsilon}_1' + 2\tilde{\epsilon}_2} \right) \quad (3.6)$$

Así, de manera sucesiva hasta llegar a la capa $N+1$, de forma que la esfera multicapa se caracteriza por una permitividad compleja equivalente $\tilde{\epsilon}_N'$,

$$\left(\frac{\tilde{\epsilon}_N' - \tilde{\epsilon}_{N+1}}{\tilde{\epsilon}_N' + 2\tilde{\epsilon}_{N+1}} \right) = \left(\frac{R_{N+1}}{R_N} \right)^3 \left(\frac{\tilde{\epsilon}_{N-1}' - \tilde{\epsilon}_{N+1}}{\tilde{\epsilon}_{N-1}' + 2\tilde{\epsilon}_{N+1}} \right) \quad (3.7)$$

que, introducida a través del factor de Clausius-Mossotti en las ecuaciones (3.1) a (3.3), proporciona de manera analítica la fuerza DEP y el torque ER para una partícula con varias capas.

3.2.2. MODELO ELIPSOIDAL

En las numerosas las ocasiones en las que las células bajo experimentación DEP presentan geometría alargada, la evaluación del momento dipolar de la partícula rodeada de una capa no resulta tan simple como en el caso esférico. Normalmente este tipo de células se modelizan por medio de geometrías elipsoidales, como es el caso, por ejemplo, de la aproximación usual a los glóbulos rojos por medio de elipsoides oblatos de excentricidad considerable. Analíticamente, la resolución del problema se realiza mediante la ecuación de Laplace en coordenadas elipsoidales, con sus correspondientes condiciones de contorno –continuidad del potencial y de la componente normal de la densidad de vector desplazamiento en las interfases–. La capa concéntrica generada alrededor de la partícula inicial, en coordenadas elipsoidales, exige generar tal superficie manteniendo constante la coordenada ξ creando un elipsoide confocal, y por tanto una capa de espesor no uniforme,

como la que se muestra en la Figura 3.2. A través de la resolución de la ecuación de Laplace, se obtiene la expresión para la permitividad compleja efectiva del elipsoide $\tilde{\epsilon}'_{pk}$, según cada una de las direcciones x, y o z , indicadas de forma genérica por k

$$\tilde{\epsilon}'_{pk} = \tilde{\epsilon}_m \left[\frac{\tilde{\epsilon}_m + \nu(\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_m)(B_{1k} - A_{0k} + 1)}{\tilde{\epsilon}_m + \nu(\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_m)(B_{1k} - A_{0k})} \right] \quad (3.8)$$

con $\tilde{\epsilon}_m$ y $\tilde{\epsilon}_i$ las permitividades complejas de la membrana y del interior celular; ν el cociente entre los volúmenes de la zona interior y el total de la célula, a los que se asigna el subíndice 1 y 0, respectivamente; A_{1k} y B_{0k} son las integrales elípticas correspondientes a los factores de depolarización. Una vez evaluado $\tilde{\epsilon}'_{pk}$, la componente k del momento dipolar efectivo de la ecuación (3.1) toma la forma,

$$\tilde{p}_k = \frac{4\pi a_0 b_0 c_0}{3} \epsilon_{ext} \left[\frac{\tilde{\epsilon}'_{pk} - \tilde{\epsilon}_{ext}}{\tilde{\epsilon}_{ext} + (\tilde{\epsilon}'_{pk} - \tilde{\epsilon}_{ext}) A_{0k}} \right] E_k \quad (3.9)$$

con a_0, b_0 y c_0 los semiejes del elipsoide y $\tilde{\epsilon}_{ext}$ la permitividad del medio externo.

La restricción que plantea el modelo analítico para las partículas elipsoidales ha sido señalada por otros autores (Asami *et al.* 1980; Jones 1995; Gheorghiu y Asami 1998; Gimsa y Wachner 1999) como fuente de incorrecciones en la evaluación de los distintos parámetros de interés para el análisis de su comportamiento eléctrico, pudiendo llegar a afectar notablemente en la precisión de los resultados. Del mismo modo, la caracterización dieléctrica de células con geometría elipsoidal a partir del modelo analítico supone la introducción de errores tanto mayores cuanto más acusada es la excentricidad de la partícula.

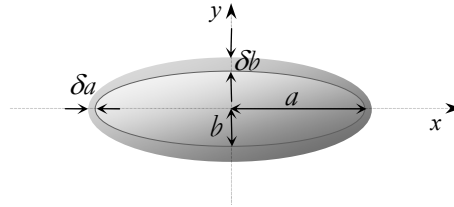


Figura 3.2. Modelo analítico para una partícula elipsoidal confocal, rodeada por una capa de espesor no uniforme a lo largo de su perímetro.

A partir de lo anteriormente expuesto, puede concluirse que tanto en la aplicación de la teoría dieléctrica de Fricke y sus modelos multicapa, como en la del momento dipolar efectivo, los resultados se obtienen en base a soluciones analíticas de la ecuación de Laplace aplicada a modelos normalmente esféricos o elipsoidales. Este último caso presenta el problema añadido de que la solución analítica impone la generación de capas de espesor no uniforme, ya que la resolución mediante la separación de variables solo es posible cuando las superficies que definen la geometría son elipsoides confocales, pudiendo suponer en algunos casos una importante limitación del modelo. De todo esto se infiere que para poder ampliar geometrías

distintas a la esférica o elipsoidal, y con el fin de lograr una mayor aproximación a la realidad geométrica de la partícula, o prescindir de las geometrías elípticas confocales, es imprescindible recurrir a métodos numéricos.

3.3. MÉTODOS NUMÉRICOS

La evaluación teórica de los campos eléctricos en su interacción con las partículas dieléctricas pasa, por tanto, a ser dependiente de las técnicas numéricas cuando se realiza una mayor aproximación a la geometría real de la célula. Los métodos numéricos comúnmente empleados para la resolución de problemas electromagnéticos son métodos en los que diversos procedimientos elementales se aplican de forma sistemática e iterativa en la mayoría de los casos. Dentro de estos métodos, unos implican todo el volumen de estudio y trabajan con ecuaciones diferenciales —los métodos de diferencias finitas (*Finite Difference Method*, FDM) y de elementos finitos (*Finite Element Method*, FEM)—, mientras que es posible limitarse a las fronteras del dominio computacional trabajando con ecuaciones integrales en el método de los elementos de contorno (*Boundary Element Method*, BEM). La elección del método adecuado depende de factores tales como la geometría del problema, la región de interés y sus posibles simetrías, la linealidad o no linealidad de los medios implicados, además de los recursos de computación disponibles. Enfocando nuestro problema desde el método de los momentos, su resolución consiste en calcular la carga inducida en cada interfase de la partícula en cuestión, a partir de la cual obtendremos el momento inducido y otras magnitudes derivadas de interés. Centraremos por tanto la atención en las interfases de las distintas capas de modelos con geometrías curvas, sobre los que puede aplicarse simetría rotacional para simplificar la resolución del problema. Los métodos de planteamiento diferencial o variacional presentan la dificultad de que sus mallados no pueden ajustarse fácilmente a los contornos curvos; además el mallado tridimensional supondría implicar todo el volumen cuando sólo es necesario abarcar las superficies de separación entre los distintos medios. Esto supone un consumo de recursos computacionales muy elevado y no siempre disponible que puede evitarse empleando el planteamiento integral del problema mediante el método de los elementos de contorno. A pesar de que trataremos sistemas heterogéneos, y de que por tanto, existirá discontinuidad de las propiedades eléctricas en las fronteras, el método BE es el más adecuado. A diferencia del BEM estándar para el cálculo del potencial, la variante desarrollada de dicha técnica se aplica para el cálculo directo de las densidades de carga sobre las superficies de un dieléctrico, del que se puede resaltar asimismo la capacidad de adaptación a las distintas dimensiones que se encuentran en el problema, como son las micras del radio de la partícula y los nanómetros de los espesores de las capas.

3.3.1. EL MÉTODO DE LOS ELEMENTOS DE CONTORNO

Para abordar el problema y evaluar la fuerza dielectroforética, superando las complicaciones que presenta para ello el tensor de Maxwell o las contribuciones multipolares, se ha recurrido al método del momento dipolar efectivo. Mediante esta aproximación el comportamiento de una partícula dieléctrica con pérdidas, sumergida en un medio conductor

y bajo la presencia de un campo eléctrico alterno, puede analizarse como el de un dipolo puntual que situado con su centro en la misma posición que la partícula original, genera la misma perturbación del campo —presenta el mismo valor del campo y del retardo en la fase y en el tiempo respecto al campo aplicado que la partícula original—. Al tratar sistemas con pérdidas, la permitividad que caracteriza a cada medio es una magnitud compleja, $\tilde{\epsilon}$, presentando dependencia con la frecuencia según la expresión $\tilde{\epsilon} = \epsilon - i\sigma/\omega$. De esta manera pueden describirse los fenómenos dispersivos presentes en las partículas heterogéneas considerando, por un lado, el desplazamiento de las cargas ligadas por medio del parámetro ϵ y, por otro, el movimiento de carga libre a través de σ , siendo ambos fenómenos inducidos por el campo externo. El fenómeno de relajación dominante en la experimentación dielectroforética por encima de los 100 kHz y debajo de los GHz es el efecto de polarización interfacial Maxwell-Wagner: como consecuencia de las diferentes propiedades dieléctricas de los dos medios en contacto, tras la aplicación del campo eléctrico las cargas libres se disponen a lo largo de una fina capa sobre la interfase, considerando que no hay difusión iónica —la longitud de Debye es pequeña en comparación con las dimensiones consideradas en la partícula— y que, por tanto, las cargas se distribuyen en la superficie y no en el volumen. Cuando tratamos partículas biológicas —normalmente partículas con varias capas— su respuesta al campo eléctrico está influenciada por este efecto dispersivo en cada una de las interfases. El hecho de que la relajación interfacial Maxwell-Wagner se produzca a frecuencias mayores que los efectos de polarización de los electrodos o de difusión iónica —del orden de kHz—, y por debajo de las frecuencias de relajación de pequeñas moléculas polares de proteínas o de las moléculas de agua ligada, presentes en el citoplasma —en el orden de 10^2 MHz hasta algunos GHz— justifica que el estudio se realice bajo la hipótesis de que tanto la permitividad ϵ como la conductividad σ son cantidades reales y constantes en los volúmenes de cada fase de la partícula heterogénea. Así, en cada interfase de separación entre dos medios con propiedades dieléctricas distintas se da el fenómeno de relajación de Maxwell-Wagner, siendo la distribución de carga interfacial objeto de nuestros cálculos para una posterior evaluación de la fuerza dielectroforética. La partícula se dispone con su eje paralelo al campo aplicado, presentando simetría rotacional axial. Del planteamiento expuesto del problema se deduce la idoneidad del método de los elementos de contorno para la resolución del problema: la discretización de las superficies requerida, la versatilidad que presenta para adaptarse a las distintas dimensiones y los menores recursos computacionales que demanda, son prueba de ello.

Supóngase el caso general de una partícula dieléctrica esférica y permitividad $\tilde{\epsilon}_p$, suspendida en un fluido con $\tilde{\epsilon}_{ext}$, y sometida a un campo eléctrico alterno linealmente polarizado de magnitud E_0 y frecuencia ω , siendo $\tilde{E} = E_0 e^{i\omega t}$, como se describe en el dibujo esquemático de la Figura 3.3. Dado que la longitud de onda a la frecuencia de aplicación del campo eléctrico es mucho mayor que la mayor de las dimensiones de la célula, se trabaja bajo la hipótesis de aproximación cuasi-estática. El campo eléctrico induce sobre la partícula un momento dipolar y, por tanto, una reorientación de las cargas ligadas, además de provocar el movimiento de sus cargas libres. Considerando asimismo la contribución del potencial externo, ϕ_0 , la expresión para el potencial eléctrico creado por la partícula en aproximación cuasi-estática viene dada por

$$\tilde{\phi}(\mathbf{r}) = \phi_0(\mathbf{r}) + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int_S \frac{\tilde{\kappa}(\mathbf{r}')}{R} dS' \quad (3.10)$$

siendo $\tilde{\kappa}$ la densidad de carga compleja, a cuya parte real contribuyen las densidades de carga ligada, κ_p , y de carga libre, κ_c , de la forma $\text{Re}(\tilde{\kappa}) = \kappa_p + \kappa_c$, $R = |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$ y S es la superficie de integración que representa el conjunto de las interfaces entre los diferentes medio i y j implicados en el problema.

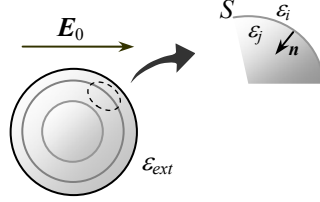


Figura 3.3. Partícula dieléctrica suspendida en un medio externo y sometida a un campo \mathbf{E}_0 . En cada interfase del problema se analiza el campo normal a dicha superficie, apuntando del medio i al medio j .

Por tanto, según la ecuación (3.10) la componente normal del campo eléctrico en un punto \mathbf{r} en la interfase, apuntando del medio i al medio j , resulta

$$\tilde{E}_{ij}(\mathbf{r}) = E_{0ij}(\mathbf{r}) - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left[\int_S \tilde{\kappa}(\mathbf{r}') \frac{\partial G}{\partial n} dS' + 2\pi\tilde{\kappa}(\mathbf{r}) \right] \quad (3.11)$$

con E_{0ij} la componente normal del campo aplicado, G es la función de Green que para una geometría 3D toma la forma $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = 1/R$, con $R = |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$. Generalizando la ecuación de discontinuidad de la densidad de corriente normal a la superficie de separación de dos medios sin pérdidas para el caso de medios dispersivos, se obtiene la expresión de la densidad de carga compleja $\tilde{\kappa}$ en la interfase,

$$\tilde{\kappa} = (\tilde{\epsilon}_i - \epsilon_0) \tilde{E}_{ij} + (\tilde{\epsilon}_j - \epsilon_0) \tilde{E}_{ji} = \epsilon_0 \frac{\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_j}{\tilde{\epsilon}_j} \tilde{E}_{ij} \quad (3.12)$$

donde $\tilde{\epsilon}_i$ y $\tilde{\epsilon}_j$ son las permitividades complejas de los medios en contacto, y ϵ_0 la correspondiente al vacío; \tilde{E}_{ij} y \tilde{E}_{ji} representan las componentes normales del campo del medio i al j y viceversa, respectivamente. Con esta expresión de la densidad de carga en la ecuación (3.11) se obtiene la ecuación integral para la densidad de carga en un punto \mathbf{r} de la interfase entre dos medios dieléctricos i y j ,

$$\tilde{\kappa}(\mathbf{r}) = 2 \frac{\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_j}{\tilde{\epsilon}_i + \tilde{\epsilon}_j} \kappa_0(\mathbf{r}) - \frac{1}{2\pi} \frac{\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_j}{\tilde{\epsilon}_i + \tilde{\epsilon}_j} \sum_k \int_{S_k} \tilde{\kappa}(\mathbf{r}') \frac{\partial}{\partial n} \left(\frac{1}{R} \right) dS' \quad (3.13)$$

en la que $\kappa_0(\mathbf{r}) = \varepsilon_0 E_{0n}$, y donde el último término representa la suma extendida a todas las interfases S_k .

A partir de la ecuación integral de Fredholm de segundo tipo (3.13) para la densidad de carga inducida en la interfase entre dos medios, se plantea la resolución numérica del problema por medio del método de los elementos de contorno. La discretización de las superficies S_k se realiza aprovechando la simetría rotacional axial de la partícula modelada, dividiendo cada interfase en pequeños tiras circulares, $\Delta_1 \dots \Delta_{nk}$, perpendiculares a dicho eje, a cada una de las cuales se les asigna una densidad de carga constante. De este modo, la ecuación integral (3.13) se transforma en el sistema lineal de ecuaciones algebraicas

$$\tilde{\kappa}_i = \sum_{j=1}^N \tilde{A}_{ij} \tilde{\kappa}_j + \tilde{B}_i, \quad i = 1, \dots, N \quad (3.14)$$

donde el coeficiente \tilde{A}_{ij} representa, salvo constante, la componente normal del campo eléctrico creado en \mathbf{r}_i por la distribución uniforme de carga del elemento Δ_j , con densidad de carga unidad. Es decir,

$$\tilde{A}_{ij} = -\frac{1}{2\pi} \frac{\tilde{\varepsilon}_h - \tilde{\varepsilon}_l}{\tilde{\varepsilon}_h + \tilde{\varepsilon}_l} \int_{\Delta_j} \frac{\partial}{\partial n} \left(\frac{1}{R} \right) dS' \quad (3.15)$$

siendo $\tilde{\varepsilon}_h$ y $\tilde{\varepsilon}_l$ las permitividades de los medios en contacto en el punto \mathbf{r}_i , de modo que ahora $R = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|$. Mientras, \tilde{B}_i es proporcional a la componente normal del campo externo,

$$\tilde{B}_i = 2 \frac{\tilde{\varepsilon}_h - \tilde{\varepsilon}_l}{\tilde{\varepsilon}_h + \tilde{\varepsilon}_l} \tilde{\kappa}_0(\mathbf{r}_i) \quad (3.16)$$

Los coeficientes de la densa matriz generada se obtienen semianalíticamente empleando la integración de Gauss-Legendre sobre los campos producidos por una circunferencia uniformemente cargada. Este cálculo semianalítico admite la discretización de las superficies S_k con un número razonablemente pequeño de subareas, $\Delta_1 \dots \Delta_{nk}$, generando un número manejable de ecuaciones y proporcionando soluciones numéricas estables con sólo 100 unidades de discretización. Una vez obtenidos los coeficientes \tilde{A}_{ij} y \tilde{B}_i se obtienen las densidades de carga de polarización $\tilde{\kappa}_i$, a partir de las que se calcula de forma directa el momento dipolar inducido por el campo a través de la relación

$$\tilde{\mathbf{p}}_{ef} = \sum_{i=1}^N \tilde{\kappa}_i \Delta_i \mathbf{r}_i \quad (3.17)$$

pudiendo entonces obtenerse cualquier otra magnitud de interés relacionada para el análisis del problema, tal como la polarizabilidad de la partícula, la fuerza de interacción entre varias de ellas o el potencial transmembrana inducido.

En una primera exposición del método presentado, Sancho (Sancho *et al.* 2003) remarcó su validez y fiabilidad al comprobar que éste proporciona una aproximación realista de la partícula tal que supone eludir los errores —de hasta un 30%, en los casos de partículas

heterogéneas con gran excentricidad— que introducen los modelos analíticos. Este hecho muestra el alcance que puede acarrear el empleo de modelos confocales para la estimación de la respuesta eléctrica de una célula al campo. A su vez, el cálculo directo de la densidad superficial de carga en el nuevo planteamiento de la técnica numérica, evita los posibles errores generados por la derivación numérica del potencial obtenido mediante el método BE estándar o a las técnicas FE.

Para contrastar los resultados aportados por el método numérico presentado con el modelo analítico expuesto anteriormente, se ha calculado la densidad de carga inducida en las interfases citoplasma-membrana y membrana-medio externo en una partícula elipsoidal. Los parámetros geométricos y eléctricos empleados son $a = 1 \mu\text{m}$, $b = c = 0.2 \mu\text{m}$ para las longitudes relativas de los semiejes, con el espesor de la membrana en la dirección de los ejes mayor y menor $\delta a = 0.01 \text{ nm}$ y $\delta b = 0.058 \text{ nm}$, respectivamente. Las permitividades y conductividades de cada una de las fases implicadas son citoplasma, $\epsilon_c = 50\epsilon_0$, $\sigma_c = 0.1 \text{ S/m}$, membrana, $\epsilon_m = 10\epsilon_0$, $\sigma_m = 1 \text{ mS/m}$ y medio externo $\epsilon_{ext} = 80\epsilon_0$, $\sigma_{ext} = 0.5 \text{ mS/m}$. En la Figura 3.4 se muestran los resultados obtenidos para la densidad de carga en cada interfase según el modelo elipsoidal analítico de membrana no uniforme, y según el modelo numérico resuelto con BEM, que permite un espesor uniforme $\delta = \delta a$.

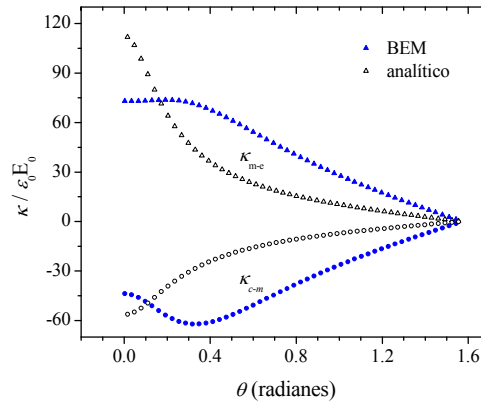


Figura 3.4. Densidad de carga inducida en las interfases citoplasma-membrana, κ_{c-m} y membrana-medio externo, κ_{m-e} . θ es la coordenada angular del punto a lo largo del contorno de la superficie.

La diferencia entre los resultados es importante especialmente en la región próxima a los polos de la célula, lo que explica las limitaciones señaladas del modelo analítico para la correcta evaluación del comportamiento eléctrico de la célula. Otro hecho importante que se refleja en la figura es que el campo en la membrana no es uniforme dado que las densidades de carga $\kappa_{m-e} \neq -\kappa_{c-m}$, tendencia que se muestra más acusada en el caso en el que la membrana presenta un espesor variable.

3.4. VARIACIÓN DE PARÁMETROS. SENSIBILIDAD DE CARACTERIZACIÓN

La caracterización de las partículas y, más concretamente, de células biológicas a partir del espectro dielectroforético supone resolver un problema inverso en el que el punto de partida consiste en establecer una relación entre una magnitud física detectable en el espectro y el modelo empleado en base a parámetros geométricos o dieléctricos. La polarizabilidad α de una partícula es una magnitud que relaciona el campo eléctrico con el momento dipolar que este induce, a través de la relación

$$\tilde{p} = \tilde{\alpha}(\omega) \tilde{E} \quad (3.18)$$

De esta forma, una vez evaluado el momento dipolar, según la ecuación (3.1), y conocido el campo externo aplicado, se obtiene la polarizabilidad de la partícula a partir de la que se puede extraer información sobre sus parámetros dieléctricos por medio del factor de Clausius-Mossotti efectivo, calculado numéricamente. Este factor contiene toda la información relativa a la dependencia frecuencial de la respuesta de la partícula. La posibilidad de que la medida del espectro permita determinar de manera fiable los parámetros eléctricos que caractericen a la célula, plantea la cuestión de hasta qué punto el espectro es sensible a los parámetros. Siendo fijos ϵ_{ext} y el radio a de la partícula, se ha realizado un estudio sobre la influencia de los parámetros dieléctricos a través de \tilde{f}_{CM} sobre el espectro dielectroforético en las regiones de alta y baja frecuencia.

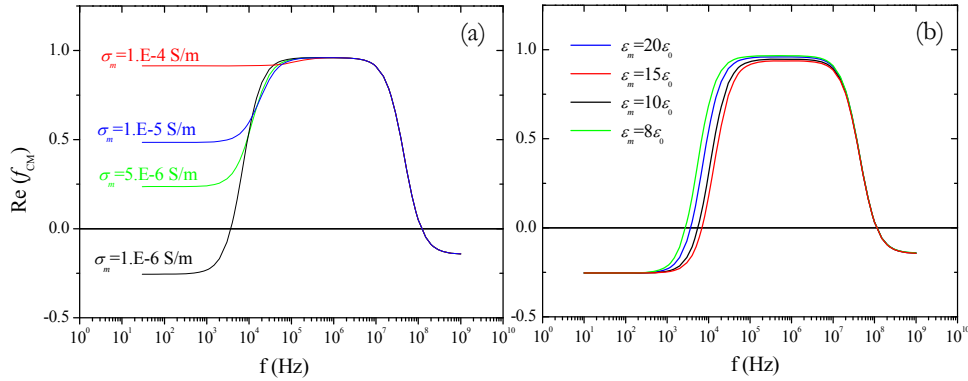


Figura 3.5. Influencia de las variaciones de los parámetros asociados a la membrana –(a) conductividad, (b) permitividad– sobre el la parte real del factor de Clausius-Mossotti en la zona de bajas frecuencias del espectro.

En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestra la influencia de los parámetros dieléctricos de la membrana y los asociados al citoplasma, en el caso de una biopartícula esférica rodeada de una membrana, cuyos parámetros dieléctricos son $\epsilon_c = 50\epsilon_0$, $\sigma_c = 0.5$ S/m, $\epsilon_m = 15\epsilon_0$, $\sigma_m \approx 0$ y $\epsilon_{ext} = 80\epsilon_0$, $\sigma_{ext} = 1.5$ mS/m. La evidencia de una clara distinción entre las células viables

—membranas más aislantes— y las no viables —membranas conductoras— a través del análisis del espectro DEP, se detecta en la figura 3.5(a) donde la conductividad de la membrana celular es el punto clave. La variación de los valores de la permitividad de la membrana en el rango de valores normalmente asociados a dicho parámetro, aparece en la figura 3.5(b). Tales variaciones pueden darse como consecuencia de modificaciones estructurales —cambios de las proporciones lipídicas o asociación de grupos moleculares a la membrana—, o cambios morfológicos —invaginaciones, pliegues y formación de bolsas—. Estas variaciones, asociadas con el parámetro de la frecuencia de cruce f_{co} , son fundamentales para la caracterización de las membranas en células viables en fases de crecimiento o estados fisiológicos diversos.

Por su parte, el interior celular se ve afectado a altas frecuencias —Figura 3.6(a)— cuando el campo eléctrico ha superado la barrera de la membrana. El espectro responde de forma evidente a cambios en su contenido iónico a través de la conductividad asociada, cambios que están relacionados con procesos fisiológicos, exposición a agentes químicos externos o envejecimiento. En cambio, la variación de la permitividad del citoplasma —Figura 3.6(b)— por debajo de $80\epsilon_0$, valor normalmente asignado al citoplasma por su composición acuosa, muestra menor influencia sobre la respuesta DEP.

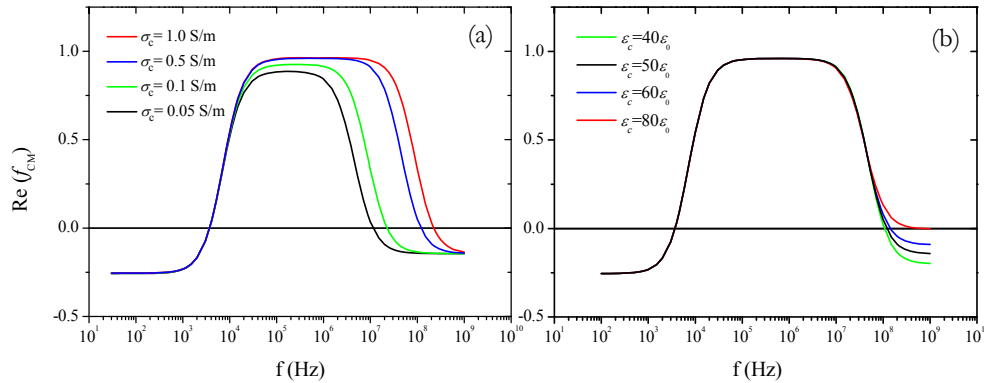


Figura 3.6. Influencia de las variaciones de los parámetros asociados al citoplasma —(a) conductividad, (b) permitividad— sobre el la parte real del factor de Clausius-Mossotti en la zona de frecuencias más altas del espectro.

Recogiendo estas observaciones por medio de un parámetro normalizado de sensibilidad, definido por

$$S(P) = \frac{\Delta f_{\text{CM}} / f_{\text{CM}}}{\Delta P / P} \quad (3.19)$$

donde P representa el parámetro analizado en cada uno de los casos, se ha estudiado la sensibilidad del método respecto a la variación de los parámetros dieléctricos celulares. En las Figuras 3.7(a) y (b) se muestra la sensibilidad del modelo a las variaciones de la conductividad y permitividad de la membrana. En la figura 3.7(a) aparece también, por comparación al parámetro de sensibilidad, la parte real del factor de Clausius-Mossotti.

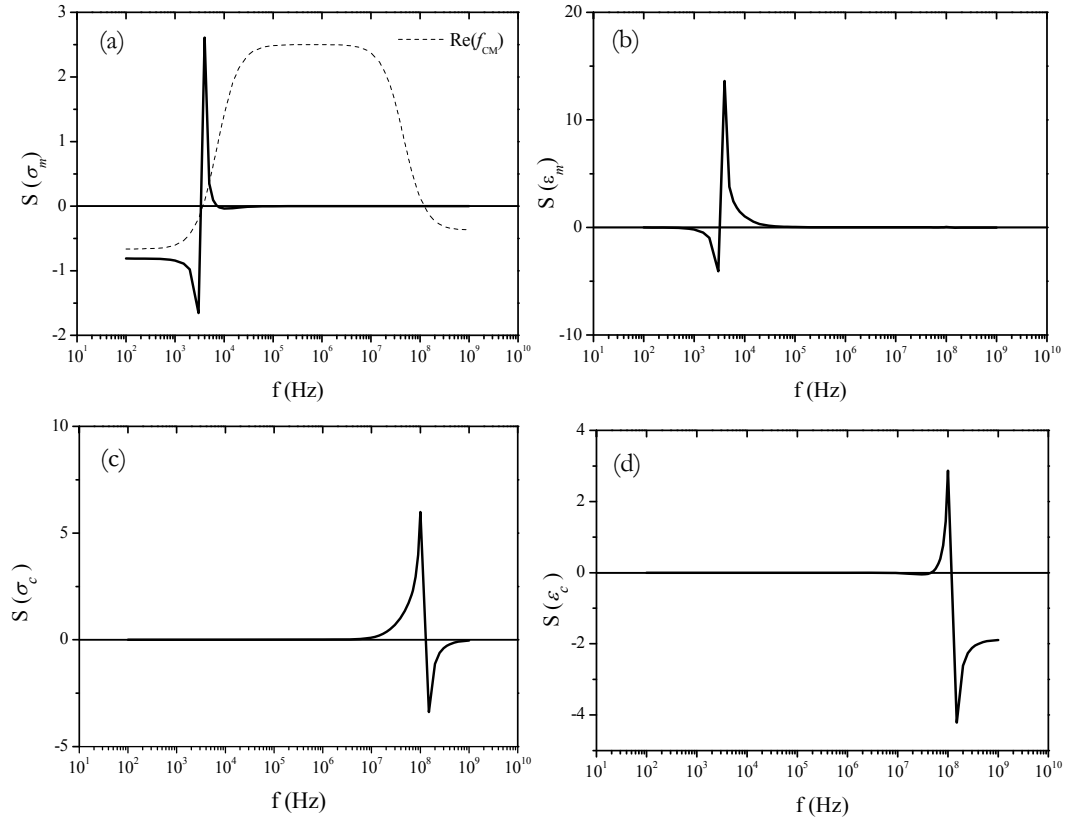


Figura 3.4. Sensibilidad del modelo de una célula esférica a las variaciones de (a) conductividad de la membrana; (b) permitividad de la membrana, (c) conductividad del citoplasma y (d) permitividad del citoplasma, en el espectro DEP. (Obsérvense las diferentes escalas en las figuras)

A partir de los resultados se infiere que la detección a través del espectro DEP de los cambios asociados a los compartimentos celulares presenta una mayor sensibilidad a la variación de la permitividad de la membrana, seguida por la de la conductividad del citoplasma, de la permitividad del mismo y la de la conductividad de la membrana. Como cabía esperar desde el punto de vista físico, los parámetros de la membrana afectan a la región de baja frecuencia, mientras que los del citoplasma lo hacen en alta frecuencia.

3.5. CONCLUSIONES

El método numérico expuesto, basado en la técnica de los elementos de contorno para el cálculo de la densidad superficial de carga inducida en las interfases, presenta gran validez y potencialidad para el análisis de situaciones en que partículas de diversa naturaleza se

encuentran sujetas a la acción de campos eléctricos AC externos. Frente a métodos empleados previamente para la evaluación del fenómeno dielectroforético o, por extensión, de los fenómenos electrocinéticos, nuestro método presenta una mayor versatilidad frente a los medios y geometrías de las partículas, resultando fundamental para la evaluación de los procesos dielectroforéticos y, sobre todo, para una correcta y más precisa caracterización celular como consecuencia de una mayor aproximación a la realidad de la partícula. De esta manera, esta herramienta analítica para la resolución del problema inverso proporcionará un mayor conocimiento de la relación entre la fisiología o estado de la célula y su comportamiento eléctrico. Por ende, el método no requiere una excesiva demanda de recursos computacionales dada la división de las superficies, característica de los métodos de los elementos de contorno. La convergencia de la solución numérica se alcanza con un número de divisiones de tan sólo $N \sim 100$ unidades, manteniéndose incluso para grandes valores de N . Las aplicaciones, expuestas a continuación en la presente tesis, son una extensión del trabajo que comenzó con el desarrollo del método numérico, y vienen a demostrar su validez y potencialidad.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Asami K, Hanai T y Koizumi N (1976). *Dielectric Properties of Yeast-Cells*. Journal of Membrane Biology 28(2-3): 169.
- Asami K, Hanai T y Koizumi N (1980). *Dielectric Approach to Suspensions of Ellipsoidal Particles Covered with a Shell in Particular Reference to Biological Cells* Japanese J. Appl. Phys. 19: 359.
- Asami K, Takahashi Y y Takashima S (1989). *Dielectric-Properties of Mouse Lymphocytes and Erythrocytes*. Biochimica Et Biophysica Acta 1010(1): 49.
- Asami K y Yamaguchi T (1992). *Dielectric Spectroscopy of Plant Protoplasts*. Biophysical Journal 63(6): 1493.
- Crane JS y Pohl HA (1972). *Theoretical Models of Cellular Dielectrophoresis*. Journal of Theoretical Biology 37(1): 15.
- Fricke H (1925). *A Mathematical Treatment of the Electric Conductivity and Capacity of Disperse Systems II. The Capacity of a Suspension of Conducting Spheroids Surrounded by a Non-Conducting Membrane for a Current of Low Frequency*. Physical Review 26 678.
- Gheorghiu E y Asami K (1998). *Monitoring Cell Cycle by Impedance Spectroscopy: Experimental and Theoretical Aspects*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45(2): 139.
- Gimsa J y Wachner D (1999). *A Polarization Model Overcoming the Geometric Restrictions of the Laplace Solution for Spheroidal Cells: Obtaining New Equations for Field-Induced Forces and Transmembrane Potential*. Biophysical Journal 77(3): 1316.
- Hanai T (1960). *Theory of the Dielectric Dispersion Due to the Interfacial Polarization and Its Application to Emulsions*. Colloid & Polymer Science 171(1): 23.
- Irimajiri A, Hanai T y Inouye A (1979). *Dielectric Theory of Multi-Stratified Shell-Model with Its Application to a Lymphoma Cell*. Journal of Theoretical Biology 78(2): 251.
- Jones TB (1995). *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pastushenko VP, Kuzjmin PI y Chizmadzhev YA (1985). *Dielectrophoresis and Electrorotation - a Unified Theory of Spherically Symmetrical Cells*. Studia Biophysica 110(1-3): 51.
- Sancho M, Martinez G y Martin C (2003). *Accurate Dielectric Modelling of Shelled Particles and Cells*. Journal of Electrostatics 57(2): 143.
- Sauer F y Schlögl R (1985). *"Torques Exerted on Cylinders and Spheres by External Electromagnetic Fields: A Contribution to the Theory of Field Induced Cell Rotation"*, in *Interactions between Electromagnetic Fields and Cells*. Chiabrera A, Nicolini C, Schwan HP, eds. New York, Plenum Publishing Corp: 203.

Capítulo 4

CARACTERIZACIÓN DIELECTRICA DE BACTERIAS

*A partir de las medidas del espectro de la colección dielectroforética de suspensiones bacterianas, en concreto del *Staphylococcus aureus* –*Staph. aureus*– y de la *Escherichia coli* –*E. coli*–, se han obtenido las características dieléctricas de ambas bacterias. Se han interpretado los experimentos mediante el método numérico previamente expuesto, en el que las células son modelizadas como partículas compartimentadas de geometría esférica y cilíndrica con extremos semiesféricos, respectivamente. En base a la información obtenida mediante la caracterización, se ha examinado la utilidad de la combinación de la dielectroforesis con el método numérico como técnica de diferenciación de los tipos bacterianos gram-positivo y gram-negativo. En segundo lugar y como extensión del punto anterior, se han analizado efectos antibióticos sobre el comportamiento dielectroforético de las bacterias.*

4.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Células de diferentes especies, estado de diferenciación o estado fisiológico presentan considerables diferencias en su morfología, estructura o composición, lo que implica diferencias en su polarizabilidad efectiva y, correspondientemente, en su respuesta dielectroforética. Esta es la razón por la cual la dielectroforesis ya se ha establecido como método para la separación y clasificación de partículas en base a sus comportamientos diversos frente al campo aplicado. Pero el problema inverso que se plantea, es decir, la extracción de las propiedades dieléctricas de las células a partir de la respuesta DEP, exige por un lado, establecer una relación entre los datos experimentales y los parámetros eléctricos, y por otro, el respaldo de un modelo dieléctrico para la célula. Normalmente, la medida experimental en el fenómeno DEP consiste en el conteo de las células colectadas sobre los electrodos bajo DEP positiva, mientras que el modelo dieléctrico de la célula proporciona su polarizabilidad en términos de sus parámetros dieléctricos y estructurales.

El siguiente paso, consistente en la inferencia de información sobre la fisiología de la célula en base a sus propiedades dieléctricas, es el punto en el que el campo de la Física establece un puente con otros campos del conocimiento, como son el de la Biología, y más concretamente en este caso, el de la Microbiología. Sobre dicha relación existen algunas evidencias en la bibliografía reciente, pudiendo deducirse, por ejemplo, la habilidad de las células para mantener un correcto balance iónico, esencial para su estado funcional, en base a las propiedades dieléctricas de membrana y citoplasma. De forma más genérica, las diferencias en los espectros DEP pueden explicarse en términos de la conductividad del medio circundante, del tamaño total de la célula y sus compartimentos, de la carga superficial –fuertemente influenciada por el número de grupos cargados en la pared celular–, de la conductividad y morfología de la membrana, así como en términos de la presencia de vesículas membranosas en el citoplasma. Estas relaciones se han aplicado en diversos trabajos empleando la dielectroforesis, por ejemplo, para la detección selectiva de bacterias por medio del ajuste de la conductividad del medio externo (Markx *et al* 1996). El conocimiento previo de que las grandes diferencias entre paredes bacterianas de diversas especies –debido a sus mecanismos de intercambio iónico– confieren grandes diferencias en la conductividad específica del organismo (Markx *et al* 1994), justificaba el estudio. En otras investigaciones, la DEP se combina con ensayos inmunológicos planteando otras técnicas de selección entre bacterias, al aprovechar la reacción anticuerpo-antígeno que crea la aglutinación de una de ellas y que provoca un aumento aparente de su tamaño celular, por lo que la fuerza DEP resulta dominante sobre éstas (Suehiro *et al* 2003). Dicho estudio viene a confirmar la importancia de la capa más externa de las bacterias, donde se encuentran los componentes químicos responsables de sus características antigénicas o patógenas (Hecker *et al* 2003). Y sobre la membrana, son varios trabajos los que emplean la dielectroforesis para analizar diversos microorganismos, en los que se concluye que la membrana manifiesta una conductividad mayor en células no viables que en las viables, lo que a su vez podría explicar la disminución observada para la conductividad interna de la célula debida al flujo iónico a través de la membrana (Huang *et al* 1992; Suehiro *et al* 2003; Lapizco-Encinas *et al* 2004).

En base a estos estudios dielectroforéticos realizados se ha establecido una base para la comprensión de la fisiología celular en relación con los campos electromagnéticos. Pero además de la caracterización dieléctrica de las células, la dielectroforesis puede ser una herramienta eficiente para la rápida identificación y evaluación de microorganismos mediante un conveniente análisis de la colección dielectroforética de los mismos. El trabajo realizado por Milner proponía una técnica combinada –medida de la impedancia dielectroforética o DEPIM– a través de la que se pretendía mejorar la cuantificación de la colección dielectroforética respecto a las técnicas ópticas, midiendo la impedancia de la suspensión bacteriana recogida sobre los electrodos por efecto dielectroforético (Milner *et al* 1998). Poco después aparecía publicada una ampliación de dicho trabajo, afirmando la potencialidad de la monitorización de la variación temporal de la impedancia eléctrica para evaluar rápidamente la presencia de microorganismos en medios acuosos (Allsopp *et al* 1999). Prácticamente de manera paralela, el grupo de Suehiro presentaba este método DEPIM para el análisis de la calidad del agua (Suehiro *et al* 1999). Más tarde, el método se empleaba para realizar una detección selectiva de bacterias viables de la especie *E. coli*, colectándolas mediante electrodos interdigitados y suponiendo que la conductancia medida entre éstos es proporcional al número de células recogidas (Suehiro *et al* 2003). A partir de los resultados obtenidos encontraron además diferencias dieléctricas entre las bacterias no viables, dependiendo de si habían sido sometidas a esterilización por tratamiento térmico o radiación UV. De acuerdo con sus observaciones y estudios previos dedujeron que el aumento de temperatura implicaba modificaciones estructurales en la membrana, provocando a su vez alteraciones en el interior celular; mientras, la luz UV no inducía cambios estructurales aparentes en la membrana, que pudieran verse reflejados en las propiedades dieléctricas de la célula, ya que dañaba directamente al ADN en el interior celular. La posible detección de diferencias dieléctricas relacionadas esta vez con la sensibilidad o resistencia bacteriana a determinados antibióticos era el objetivo del trabajo presentado por el grupo de Johari (Johari *et al* 2003). En concreto, emplearon la técnica DEP para detectar la sensibilidad y resistencia antibiótica de cepas del *Staphylococcus epidermidis* frente a la estreptomycin. Para ello emplearon un dispositivo experimental compuesto por un par de agujas enfrentadas a modo de electrodos, e interpretaron la colección dielectroforética de células como proporcional a los valores de la polarizabilidad.

Respecto a estos trabajos, el presente estudio pretende mejorar las condiciones tanto experimentales como teóricas de la experimentación dielectroforética como método de caracterización celular y, por extensión, de sus posibles aplicaciones. Frente al empleo de los dispositivos de experimentación más básicos –como los electrodos creados con las puntas de aguja enfrentadas–, el empleo de una cámara de microelectrodos como dispositivo experimental, permite una automatización de la toma de datos de la colección dielectroforética, además de posibilitar su integración dentro de los sistemas de miniaturización *lab-on-a-chip*. Por otro lado, frente a los modelos utilizados para la interpretación del experimento, normalmente restringidos a soluciones analíticas limitadas en su adaptabilidad a la estructura celular, el respaldo del modelo numérico desarrollado y presentado en el tercer capítulo supone una mayor fiabilidad del análisis. Recientemente, han salido a la luz nuevos estudios de caracterización dieléctrica de la bacteria *E. coli*, pero ninguno de ellos llega a cubrir las cuestiones todavía abiertas respecto a la óptima interpretación de la experimentación dielectroforética. Del primero de ellos (Bai *et al* 2006) podría resaltarse la

incorporación de las tres capas que caracterizan a esta bacteria en un modelo elipsoidal, y que únicamente fueron consideradas en el modelo esférico adoptado por Hölzel para la interpretación de los datos extraídos por electrorrotación (Holzel 1999). Aunque este modelo elipsoidal tri-capa supone una mayor aproximación a la estructura morfológica de la bacteria que el asumido por Holzöl, Bai recurre al modelo analítico confocal basándose en el trabajo de Sekine (Sekine *et al* 2002). Allí se afirma, tras el cálculo numérico comparativo de los espectros dieléctricos de suspensiones de partículas alargadas con capa –modelizadas según la geometría elipsoidal confocal usual, la no confocal y la llamada geometría *bastón* consistente en un cilindro con extremos semiesféricos–, que las diferencias introducidas por el modelo analítico confocal respecto a los modelos numéricos no suponen graves consecuencias en la interpretación de los experimentos. Esta afirmación es contraria tanto a lo señalado por otros autores (Jones 1995; Gheorghiu y Asami 1998; Gimsa y Wachner 1999; Sancho *et al* 2003), como a la información proporcionada por nuestro método, como se vio en el capítulo tercero. En su estudio, Sekine emplea el método estándar de elementos de contorno por lo que, a los errores intrínsecos de la solución numérica del potencial eléctrico, hay que añadir las inexactitudes del resultado debido al carácter indirecto de la extracción de la permitividad compleja de la suspensión. Para ello iguala el potencial creado en una región esférica de la suspensión a la suma de los potenciales creados por los dipolos inducidos por las N partículas de la región considerada. El segundo estudio busca la caracterización y diferenciación de distintas mutantes isogénicas de la *E. coli* mediante la dielectroforesis (Castellarnau *et al* 2006). Contando con la microtecnología para el dispositivo experimental, los parámetros eléctricos de las bacterias mutantes analizadas se extraen mediante la detección de la frecuencia de cruce característica, en base a un modelo analítico de geometría elipsoidal con dos capas confocales, lo que sigue suponiendo, bajo nuestro punto de vista, una pérdida de información y, por tanto, de precisión en los resultados. Y en el tercero, y más reciente de los estudios, se presenta la DEP como método para una rápida detección de la muerte celular de las bacterias por la acción bactericida de un determinado antibiótico (Hoettges *et al* 2007). Para ello se muestra como los primeros cambios electrofisiológicos inducidos por la poliximina B sobre la *E. coli* se detectan en la respuesta DEP tras sólo 1 h de exposición al antibiótico. Tras el seguimiento de la reacción de la bacteria en otros periodos de tiempo cortos –2 y 4 horas–, el comportamiento DEP se muestra claramente diferente entre ellos y a su vez diferente de la respuesta control de la bacteria. Tras 4 horas de tratamiento se detecta una drástica caída de la conductividad del citoplasma –un 86 % de su valor inicial– que indica la no viabilidad de la célula debido a la disrupción de la membrana bajo la acción de la poliximina B. A diferencia de nuestro estudio, el análisis de Hoettges se basa en un modelo simplificado para la *E. coli* –geometría esférica con una única capa, que integra pared y membrana, rodeando el citoplasma–, lo que supone una falta de precisión considerable en la caracterización de la bacteria, aún cuando el resultado presentado tenga validez cualitativa. Lo más novedoso del trabajo es el aspecto tecnológico, por cuanto el dispositivo empleado –un pozo DEP creado a través del bloque conformado por superposición alterna de láminas conductoras y aislantes– supone una alternativa eficaz cuando la litografía no es un recurso asequible.

Un último punto importante a reseñar sobre nuestro trabajo, además de las ventajas del modelo numérico empleado, es el establecimiento de la relación entre la colección DEP de bacterias sobre los electrodos y la polarizabilidad de las células individuales, extendiendo los

modelos previos válidos para geometrías cilíndricas o esféricas a nuestro dispositivo de electrodos de barras paralelas.

A partir de lo expuesto, los fines planteados mediante el empleo de la DEP como herramienta de análisis son:

- la caracterización y diferenciación de los grupos bacterianos gram-positivo y gram-negativo por medio del *Staph. aureus* y la *E. coli*, bacterias representativas de cada tipo respectivamente, y
- la detección de la acción antibiótica sobre las bacterias, tanto desde el punto de vista de una evaluación rápida de la susceptibilidad de la bacteria hacia el agente químico, como desde el de la diferenciación entre cepas sensibles y resistentes a un determinado antibiótico.

4.1.1. DIFERENCIACIÓN GRAM-POSITIVA Y GRAM-NEGATIVA

El *Staph. aureus* y la *E. coli* pertenecen a dos grupos diferenciados de bacterias: gram-positiva la primera, y gram-negativa la segunda. El método clásico de clasificación gram de las bacterias fue establecido en base a la técnica de tinción realizada por el investigador danés Christian Gram en 1884, y permite una primera diferenciación morfológica de las bacterias. La técnica consiste en someter a la bacteria a tinto con cristal violeta, seguido de una solución de yodo diluido y después de lo cual se decolora con acetona o etanol. Las células que retienen la tinción fueron llamadas gram-positivas y las que no, gram-negativas. Este hecho se debe a la diferencia en la superficie celular, mucho más compleja en las células gram-negativa que en las gram-positiva. La identificación por tinción gram ayuda a la selección de la terapia antibiótica más adecuada, dado que una correcta identificación de la bacteria ayuda a un tratamiento más efectivo, cooperando de esta manera en la reducción de la resistencia antibiótica. Además, la mayoría de las bacterias gram-positivas son sensibles a las penicilinas, mientras muchas de las gram-negativas son resistentes debido a su diferencia estructural en la pared celular. Sin embargo, dado que no todas las bacterias de importancia médica responden a la tinción, y que el procedimiento de identificación gram requiere periodos considerables de realización —debido al tiempo de cultivo necesario para el crecimiento de las cepas bacterianas—, la caracterización dielectroforética puede suponer un avance y una ayuda en el diagnóstico de laboratorio. De ahí que se busque una mejora y automatización de la metodología basada en la dielectroforesis, ya que es de esperar que, en base a las diferentes morfologías y propiedades de las células, la respuesta DEP de las bacterias gram-positiva y gram-negativa facilite la diferenciación de ambos tipos.

Las bacterias bajo estudio, el *Staph. aureus* y la *E. coli*, son bacterias que forman parte de la flora normal del ser humano. La primera de ellas vive en las fosas nasales, en las mucosas y en la piel, mientras que la segunda lo hace en el colon. Pero, en determinadas circunstancias, ambas especies resultan patógenas en mayor o menor grado. El *Staph. aureus* provoca, entre otras, la aparición de supuraciones en la piel, el síndrome del shock tóxico, intoxicaciones alimentarias y neumonías, así como numerosas infecciones intrahospitalarias. La *E. coli* fuera del tracto intestinal puede provocar diversas infecciones, como cistitis, úlceras, peritonitis y diarrea.

4.1.2. EVALUACIÓN DIELECTROFORÉTICA DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS ANTIBIÓTICOS

Conocidos los mecanismos de acción de diversos antibióticos, detectar su actividad a través de la respuesta dielectroforética implica un paso más en el estudio de la potencialidad de la dielectroforesis como herramienta analítica para la caracterización celular. Durante el periodo en el que se ha llevado a cabo esta investigación han aparecido publicados varios estudios sobre el empleo de la dielectroforesis para la evaluación de agentes químicos sobre diversos organismos celulares, evidenciando la acción de tales agentes sobre su polarizabilidad. Bajo tal premisa, uno de los objetivos planteados para la presente investigación consistía en la rápida evaluación de la susceptibilidad antibiótica mediante DEP. Los métodos convencionales de testeo de la susceptibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico (antibiogramas) requieren de periodos de cultivo de al menos 16 horas en cada una de las etapas —identificación de la bacteria a partir de la muestra del paciente y evaluación de la acción antibiótica sobre la misma—, lo que supone prácticamente dos días para dar con el tratamiento adecuado. La reducción del tiempo necesario para realizar los antibiogramas tradicionales con ayuda de la dielectroforesis es una meta perseguida desde hace algunos años por varios grupos de investigación, a cuyos trabajos nos hemos referido anteriormente. Todos ellos representan sólo el comienzo en este campo, de modo que la rápida evaluación de la sensibilidad antibiótica de las bacterias sigue siendo uno de los objetivos fundamentales pretendidos. Como se comentó, esta reducción implicaría beneficios no sólo en el ámbito de la salud pública —más eficacia en la detección y tratamiento de infecciones con la consiguiente disminución de la creación de resistencias antibióticas— sino también en el ámbito económico —menos días de hospitalización del paciente—.

Con dicho fin, en un primer planteamiento, se pretende reducir el tiempo de testeo al prescindir de la etapa de crecimiento de la bacteria en presencia del antibiótico. De este modo, se estudiaron inicialmente las respuestas DEP de la *E. coli* y del *Staph. aureus* sometidas a varios antibióticos que atacan de modos diversos la integridad de las bacterias. Asociado a al examen de susceptibilidad antibiótica de las bacterias, la detección de su resistencia a determinados antibióticos juega también un papel importante dentro del mismo contexto. Por ello, se está trabajando sobre la evaluación de la respuesta DEP de una cepa sensible y otra resistente del *Staph. aureus*, pero en esta ocasión haciendo crecer a la bacteria en un medio de cultivo bajo la acción de un determinado antibiótico.

Dos de los antibióticos cuya acción se ha analizado con mayor detenimiento durante este estudio son la ampicilina y la estreptomicina. La ampicilina actúa inhibiendo el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano en la pared celular de bacterias en crecimiento, mientras que la estreptomicina ingresa en el citoplasma e inhibe la síntesis proteica impidiendo la unión de aminoácidos. La ampicilina se une a determinadas proteínas —las *penicilin binding proteins*, PBPs— en el espacio periplásmico provocando, en unos casos, la inhibición de la formación del septo transversal de las células y favoreciendo la filamentación de éstas y, en otros casos, también la inhibición del crecimiento longitudinal originando así que la célula se redondee. En ambos casos el final es la lisis de la bacteria. Por su parte, la estreptomicina en el interior de la célula interfiere en la creación de las cadenas peptídicas, originando anomalías en las proteínas que conforman la bacteria. Algunas de estas son

proteínas de membrana, resultando así en la formación de canales en esta capa que facilitan el ingreso de más antibiótico a la célula y que, por tanto, aceleran el proceso y el fin autocatalítico. Además, aunque no altera la pared celular, sí aumenta su permeabilidad.

4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. LAS MUESTRAS BACTERIANAS

Las muestras bacterianas, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fueron obtenidas a partir de cultivos congelados/disecados del American Type Culture Collection (LGC Promochem, Teddington, UK). Fueron reconstituidos y mantenidos en reservas de nutriente agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Para la preparación del análisis dielectroforético se inoculó cada bacteria en un medio de cultivo estéril (Oxoid, Basingstoke, UK), y fue crecido durante 16 horas en un matraz con agitación constante a 150 rpm a la temperatura óptima de crecimiento. Se extrajeron tres muestras del cultivo de 1 ml, depositados en tubos esterilizados de la microcentrifugadora y centrifugados 1400 rpm durante 2 minutos. Los pellets fueron extraídos, unidos y resuspendidos en 1 ml de volumen de agua desionizada. Se centrifuga el tubo de la muestra y se lava el pellet con agua desionizada dos veces más, antes de ser finalmente resuspendida en agua desionizada. La concentración final fue ajustada para obtener $2 \cdot 10^8$ células/ml (en una cámara de conteo bacteriano Helber). Un volumen de 10 ml de esta suspensión fue tomada para el análisis. Para reproducir las mismas condiciones en todos los experimentos, la conductividad de la muestra se ajusta a 2.5 mS/m mediante la adición de volúmenes de microlitros de una solución 0.01M de KCl.

Las bacterias sometidas a tratamiento antibiótico se preparan de distinto modo según el objetivo experimental planteado. Por un lado, en el ensayo para la detección rápida de la sensibilidad antibiótica, a la suspensión bacteriana en agua desionizada –tomada como muestra control– se le añaden distintas dosis de antibiótico. Las cepas sensibles de la *E. coli* y del *Staph. aureus* se someten así a seis antibióticos de acción diversa –ampicilina, cefotaxime, tetraciclina, cloramfenicol, ciprofloxacina y gentamicina–. Las dosis empleadas se establecen a partir del rango de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) –cantidades a las que se frena el crecimiento bacteriano– para cada antibiótico y cepa, recogidas por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Inicialmente las muestras de control se tratan con las concentraciones de antibiótico correspondientes a los límites inferior y superior de su CMI, y 2.5 veces el límite superior. Es decir, la *E. coli*, por ejemplo, se somete a las dosis 2, 8 y 20 µg/ml de ampicilina, estando su CMI entre 2 y 8 µg/ml. Análogamente se procede con el resto de muestras bacterianas y sus respectivas dosis CMI para cada antibiótico. Por otra parte, con el fin de detectar la sensibilidad o resistencia de dos cepas del *Staph aureus* frente a la estreptomycinina, la bacteria se incuba en el medio de cultivo en presencia del agente antibiótico –con una CMI entre 8 y 16 µg/ml para un día de incubación–, analizando las respuestas DEP tras 2 horas. La cepa resistente del *Staph aureus* empleada, catalogada como 52081 y procedente del *York District Hospital*, se sometió a las mismas dosis de antibiótico.

4.2.2. LA CÁMARA DE MICROELECTRODOS

La cámara de los microelectrodos se fabricó en el laboratorio Protron-Mikrotechnik (Bremen, Alemania). Conforme a lo discutido en el estudio presentado en el segundo capítulo sobre el diseño de microelectrodos, con vistas a la colección de biopartículas se optó por los electrodos de dos bandas planas paralelas idénticas, con un ancho de 50 μm , 4 mm de longitud y separadas 10 μm , en una cámara de 28 μm de altura, que generan un perfil de gradiente de campo como el indicado en la Figura 4.1.

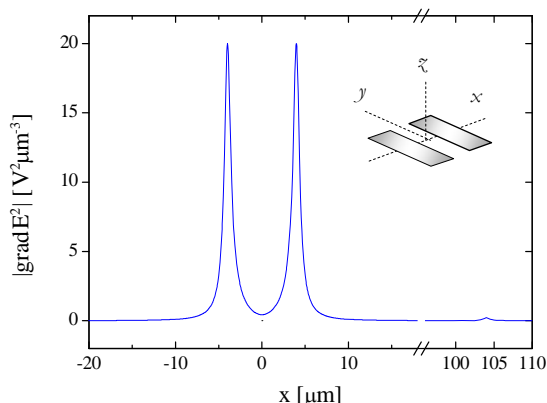


Figura 4.1. Perfil del gradiente de campo dielectroforético en un corte transversal de una cámara de medida según los resultados obtenidos mediante el análisis numérico del diseño de microelectrodos.

Dichas bandas se obtienen mediante la deposición sobre un sustrato de vidrio de una capa de cromo, primero, y otra de oro después –con 15 nm y 80 nm de espesor, respectivamente– con un último recubrimiento de nitruro de silicio de 90 nm efectuado mediante técnica PEVCD (deposición química en fase vapor asistida por plasma) con objeto de prevenir la adhesión celular sobre la superficie y prolongar la vida útil del dispositivo. Finalmente, se añade una capa de fotoresina polimérica SU-8 para delimitar un canal lineal de 28 μm de profundidad alrededor de los electrodos conformando la pared de los mismos. El acceso a la cavidad del fluido se habilita mediante una cánula de borosilicato pegada a la base del sustrato, de modo que los electrodos quedan en el interior de la cámara. Para el montaje del sistema de canales, se disuelve un adhesivo de resina epoxy curado por luz UV con γ -butirolactano y se aplica con un pincel fino sobre la superficie del SU-8. Tras un tratamiento térmico suave se consigue la evaporación de todo el diluyente, quedando una capa viscosa de adhesivo. Sobre ésta, se alinea la cánula manualmente y se aplica un vacío al sistema para eliminar las burbujas de aire. El montaje se expone a una luz UV (600W durante 300s) con objeto de curar la resina epoxy. Finalmente, se han adherido a la superficie exterior de la estructura unos bloques de conectores para microfluidos (Omnifit, Cambridge), a fin de conectar con el entubado fluídico y permitir así la recirculación de la muestra a examinar, como se muestra en la Figura 4.1.

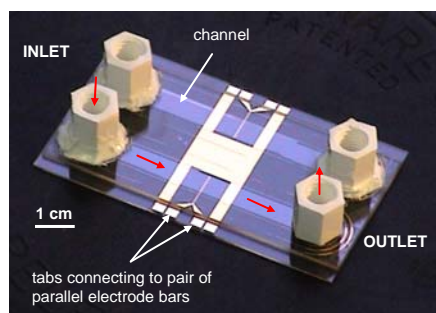


Figura 4.1. Cámara de microelectrodos para la dielectroforesis. La cámara está compuesta por dos pares de canales idénticos y microelectrodos, economizando así su manufacturación. La suspensión bacteriana se introduce por un único canal a través de un puerto de entrada *inlet*, atraviesa las barras de los microelectrodos y sale por el puerto de salida *outlet* de vuelta al vaso donde se encuentre la muestra.

4.2.3. EL SISTEMA DIELECTROFORÉTICO

El sistema se dispuso de acuerdo con el sistema de análisis de imagen empleado por Quinn en 1995, para realizar un estudio dielectroforético del parásito *Cryptosporidium* (Quinn *et al* 1995). La suspensión bacteriana se hace circular desde el vaso de precipitado que contiene la muestra, pasar a través de la cámara de los electrodos y volver nuevamente al vaso gracias a una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3, Francia). Con una segunda línea de aire se burbujea la muestra en el vaso de la reserva, con el fin de mantener una muestra homogénea. Los electrodos se disponen sobre la platina del microscopio (Nikon Labophot 2, Japón) al cuál se le acopló una cámara CCD de alta resolución. Las bandas de los microelectrodos se observan en contraste de fase usando un objetivo de 40x de larga distancia de trabajo, contabilizando las células visualizadas por el microscopio en modo continuo mediante un sistema de análisis de imagen (Domino, Perceptive Instruments, UK). Se conecta un generador de señal (Tabor 8550, Israel) a los electrodos para crear el campo eléctrico no uniforme entre los microelectrodos. Todo el sistema se controla mediante un ordenador Pentium que incorpora placas PCI para el control de todos los parámetros incluyendo la frecuencia, el voltaje pulsado y el periodo, así como el tiempo y la velocidad de bombeo. Un segundo monitor se emplea para ajustar y controlar los parámetros experimentales. El dibujo esquemático correspondiente a esta descripción se muestra en la Figura 4.2.



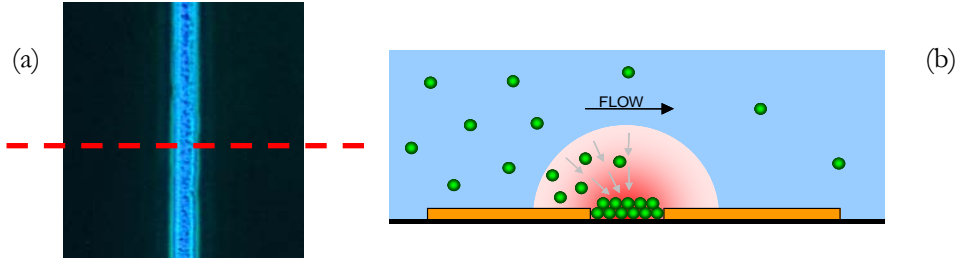
Figura 4.2. Sistema de análisis experimental DEP. La suspensión bacteriana se hace recircular a través de la cámara de microelectrodos y las imágenes son monitorizadas para cuantificar el espectro de la colección DEP.

A través de este sistema se aplica un voltaje a una frecuencia específica sobre los electrodos, originando así la agregación de células sobre estos en función de sus características dieléctricas, al tiempo que fluye la suspensión bacteriana a su través. Tras una duración específica, las células colectadas son liberadas por el cese del voltaje aplicado, permitiendo así el conteo mediante el software de análisis de imagen. El campo eléctrico se aplica a distintas frecuencias y la colección de bacterias se reevalúa. Mediante este procedimiento se obtiene el espectro frecuencial dielectroforético, tomando medidas de la colección dielectroforética relativa al barrer un rango de frecuencias.

4.2.4. LA TOMA DE DATOS

Todos los espectros DEP fueron obtenidos en el laboratorio de microbiología de Cell Analysis Ltd. de York. Las cepas de bacterias sometidas a dielectroforesis se encontraban bajo condiciones estándar. El flujo de la suspensión bacteriana se bombea de forma continua a través de los electrodos a razón de $13 \mu\text{l}/\text{min}$. Se aplica una señal del generador de $12V_{pp}$ sobre los electrodos durante 5 segundos. El procedimiento se repite para el rango de frecuencias de 10 kHz a 100 MHz, contando las partículas que se recogen sobre el borde de los electrodos a varias frecuencias por década, obteniéndose de este modo el espectro DEP. El proceso experimental se llevó a cabo treinta veces para cada una de las bacterias suspendidas en un medio buffer que mantiene la conductividad de la suspensión próxima a $2.5 \text{ mS}/\text{m}$, de modo que se favorece la colección de bacterias sobre los electrodos.

La Figura 4.3(a) muestra una fotografía de la colección de células en el gap entre los electrodos, donde la intensidad del gradiente del campo es máxima, y la 4.3(b), un dibujo esquemático de la sección transversal donde ocurre dicho proceso. Tras la colección, las células son liberadas cesando el voltaje aplicado entre los electrodos, y las células son contadas a través de una ventana sobre los electrodos (no mostrada en la figura)



Figuras 4.3. (a) Al aplicar un voltaje a los electrodos, las bacterias comienzan a ser atraídas hacia el gap donde son colectadas en las regiones de mayor gradiente de campo. (b) Representación esquemática de la sección transversal de los electrodos que muestra el mecanismo de la colección de bacterias por DEP positiva.

4.3. ANÁLISIS TEÓRICO

4.3.1. ANÁLISIS DE LA COLECCIÓN DE CÉLULAS

Con el objetivo de extraer la información relativa a las propiedades eléctricas de las células, es necesaria una teoría que relacione la colección de células y la polarizabilidad dieléctrica de cada célula. Los primeros modelos con este fin fueron desarrollados por Pohl en 1978 (Pohl 1978) y validados en sus pruebas experimentales con electrodos de geometría esférica o cilíndrica. Para el presente estudio se han extendido estos modelos para el caso de los electrodos de bandas paralelas.

Según se indicó en el capítulo dedicado al diseño de electrodos, se establece un modelo bidimensional de la cámara de medida, dada la gran longitud de los electrodos. Mediante cálculos numéricos en dicho estudio se comprobó que la altura de la cámara no afecta de manera significativa a la distribución del campo, excepto en las proximidades de la pared superior –aproximadamente a unas 5 μm –, y que el campo en las cercanías del borde externo de los electrodos es mucho menor que el producido en las proximidades del gap. Por tanto, cabe suponer que todas las células colectadas durante el intervalo de tiempo en el que el voltaje es aplicado, se encuentran sujetas al campo producido por unos electrodos semi-infinitos.

A efectos de un cálculo simple del rendimiento de la colección dielectroforética se emplea una aproximación analítica. Considerando que el espaciado entre los electrodos es muy pequeño, se obtiene el potencial, y por tanto, el campo eléctrico, mediante la expresión analítica (Nayfeh y Brussel 1985):

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{V}{\pi r} \mathbf{u}_{\varphi} \quad (4.1)$$

por lo que la fuerza dielectroforética sobre una célula resulta

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}} = \frac{1}{2} \alpha_{ef} \nabla E^2 = -\frac{\alpha_{ef} V^2}{\pi^2 r^3} \mathbf{u}_r \quad (4.2)$$

donde el campo y el voltaje están representados por los valores cuadráticos medios. La velocidad del flujo varía desde cero en las paredes hasta alcanzar un máximo en la región central de la cámara. La colección tiene lugar para células que se encuentran por debajo de una determinada altura por encima de los electrodos, que en una primera aproximación, basada en el porcentaje de células colectadas, da un valor de unas 5 μm . Por debajo de esta altura e inmediatamente por encima de los electrodos el flujo es lento, de forma que podemos despreciar la fuerza de arrastre para nuestra aproximación. A alturas mayores, el gradiente de campo es débil y las células son barridas por el flujo. Por otro lado, si bien las células sometidas a dielectroforesis suelen presentar atracción mutua debido a la polarización inducida, en el presente estudio se ha considerado que la fuerza DEP generada por los electrodos domina sobre las interacciones mutuas y que, por tanto, las células se colectan de forma individual. Un análisis detallado de este efecto de agregación requeriría la simulación del movimiento relativo de las células bajo interacción dipolar, modificado por efectos hidrodinámicos (Foster y Sowers 1995). En las condiciones de concentración y campo de nuestro experimento se pueden despreciar estas correcciones. Bajo la suposición anterior, la velocidad \mathbf{v} de la colección de células se obtiene a partir de la ley de Stokes (Hinds 1999):

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}} = 6\pi K a \eta \mathbf{v} \quad (4.3)$$

siendo K un factor de forma para las partículas no esféricas, a el radio de una esfera con el mismo volumen que la célula, y η el coeficiente de viscosidad de la suspensión. De esta manera, el tiempo requerido para que la célula se mueva una distancia r_0 a la frontera del electrodo viene dada por

$$\Delta t = \int_{r_0}^0 \frac{dr}{v} = -\frac{6\pi^3 K a \eta}{\alpha_{ef} V^2} \int_{r_0}^0 r^3 dr = \frac{3\pi^3 K a \eta}{2\alpha_{ef} V^2} r_0^4 \quad (4.4)$$

Durante este tiempo se barre el espacio semi-cilíndrico de radio r_0 sobre los electrodos, colectando todas las células contenidas en él. El número total de células es

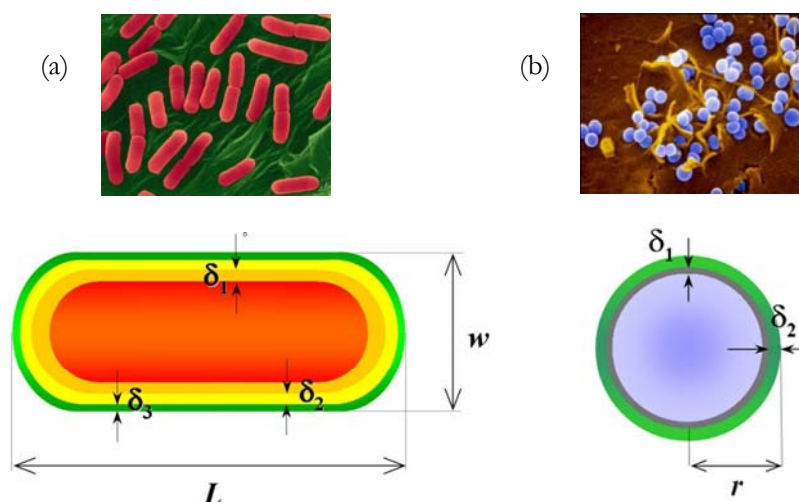
$$N = c \frac{\pi r_0^2 l}{2} = c l V \left(\frac{\alpha_{ef} \Delta t}{6\pi K a \eta} \right)^{1/2} \quad (4.5)$$

donde c es la concentración celular y l la longitud de los electrodos. La ecuación (4.5) muestra que la colección resultante durante el intervalo de tiempo Δt , con electrodos de barras paralelas, es proporcional a la raíz cuadrada de la polarizabilidad efectiva de las células.

4.3.2. MODELO DIELECTRICO DE LA BACTERIA

El método de los elementos de contorno introducido en el capítulo tercero permite tratar adecuadamente las distintas escalas implicadas en la estructura celular –micrómetros para el

radio y nanómetros para el espesor de la membrana— estableciendo un modelo dieléctrico que se ajusta a la realidad de las células, y que supone un coste computacional razonable. La geometría de los modelos con sus respectivos parámetros se muestra en las Figuras 4.4(a) y (b) junto con las imágenes de las bacterias reales. Las bacterias son modelizadas como partículas dieléctricas multicapa. El *Staph. aureus*, bacteria gram-positiva con dos capas, posee una pared con múltiples capas de peptidoglicano en contacto con el medio externo de la célula y una membrana interna rodeando al citoplasma; la *E. coli*, perteneciente a las gram-negativas, posee una superficie celular más compleja compuesta por una envoltura exterior de tipo membranoso —conocida por membrana externa—, una fina pared de peptidoglicano inmersa en lo que se conoce como espacio periplasmático —entre la membrana interna y la externa—, y la membrana citoplasmática. A cada una de las fases o compartimentos celulares considerados se les asignará las propiedades dieléctricas —permitividad y conductividad— correspondientes. En cada una de las superficies de separación entre dichas fases se calcula la densidad de carga inducida aprovechando la simetría axial de la geometría del problema. A partir de ésta se realiza una aproximación teórica al comportamiento dielectroforético de cada bacteria, cuantificando las diferencias observadas en términos de las variaciones de los parámetros dieléctricos.



Figuras 4.4(a) y (b) – Ilustraciones y modelos dieléctricos de la *E. coli* y del *Staph. aureus*. La *E. coli* (a) se representa por una partícula de tres capas con forma de bastón, cuya longitud se ha establecido en $L = 3.35 \mu\text{m}$ y su ancho $w = 0.82 \mu\text{m}$; está compuesta por citoplasma, membrana plasmática de espesor $\delta_1 = 8 \text{ nm}$, y una pared de $\delta_2 = 15 \text{ nm}$, recubierta finalmente por una membrana externa de $\delta_3 = 8 \text{ nm}$. El *Staph. aureus* (b) se modeliza como una partícula esférica de radio $r = 0.6 \mu\text{m}$ con dos capas: la membrana plasmática de espesor $\delta_1 = 8 \text{ nm}$ recubierta por la pared de $\delta_2 = 20 \text{ nm}$ de espesor.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

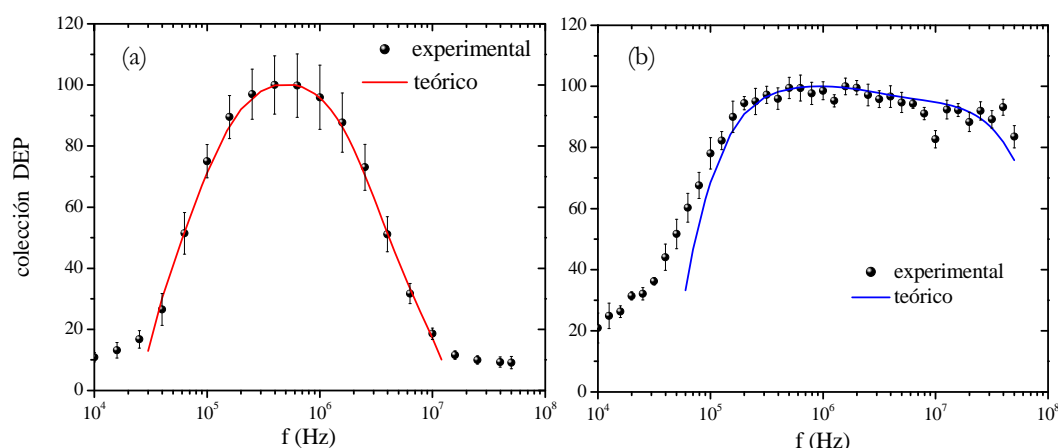
Tras evaluar el estado de las muestras sometidas a experimentación DEP, mediante técnicas estándar de microbiología, y sin haber detectado cambios significativos en la viabilidad celular, o efectos térmicos o líticos relevantes bajo las condiciones experimentales empleadas, se han analizado los resultados obtenidos a partir de la acción dielectroforética sobre las bacterias han sido admitidas a discusión. En primer lugar, se corrobora el carácter no invasivo de la técnica DEP, como en su momento lo afirmaron trabajos anteriores como el de Lee y Tai (Lee y Tai 1999) quienes tampoco detectaron lisis de la *E. coli* al someterla a campos AC bajo similares condiciones experimentales (hasta 21 kV/m y 2MHz). Como ya se señaló en el capítulo inicial, únicamente en el caso de bajas frecuencias –por debajo de 1 kHz– los efectos térmicos y electrolíticos empiezan a ser significativos, produciéndose al mismo tiempo la degradación de los electrodos y la aparición de burbujas. Por su parte, se determinó la concentración óptima de células en la suspensión para llevar a cabo la colección dielectroforética en base a la experimentación repetida con diferentes concentraciones celulares efectuada durante años previos y recogida en el trabajo de Brown (Brown *et al* 1999). Igualmente, con el objetivo de prevenir niveles excesivos en la colección de partículas, se cuidaron las condiciones experimentales de voltaje aplicado al sistema, reduciendo así la saturación de la imagen y posibles errores en su detección. De forma adicional, para prevenir la agregación celular se optimizaron las condiciones de crecimiento y suspensión de las células bacterianas. A diferencia de otros dispositivos, en este sistema la suspensión fluye continuamente en cada una de las experimentaciones, lo que ayuda a mantener la suspensión unicelular. Respecto al dispositivo, el revestimiento de los electrodos con la capa de nitruro de silicio minimizó su deterioro y la adhesión de las células, si bien las especies estudiadas presentan una adhesión mínima, lo que facilita la repetición de los experimentos. A su vez, la capa de nitruro impide la agrupación celular ya que favorece una mayor uniformidad en el momento de liberar las células de la superficie de los electrodos. El estado de los éstos durante el proceso experimental, bajo condiciones operativas normales, permaneció prácticamente inalterado sin procesos de delaminación visibles.

4.4.1. DIFERENCIACIÓN DEP GRAM-POSITIVA Y GRAM-NEGATIVA

La colección DEP de bacterias resultante y promediada para cada bacteria aparece en los espectros de las Figuras 4.5(a) y (b). Todos los datos recogidos fueron normalizados de forma que el máximo valor de células colectadas fuera la centena.

Una primera observación de los espectros DEP proporciona una idea de la influencia de las distintas propiedades morfológicas y dieléctricas de las bacterias que se traduce en dos respuestas DEP claramente diferenciadas. A partir de la aproximación del modelo teórico de cada una de las bacterias se ha procedido al ajuste de las curvas para determinar los parámetros dieléctricos que caracterizan a la célula. La estimación inicial de la respuesta DEP se ha establecido acorde con los valores geométricos y dieléctricos de cada bacteria encontrados en la literatura. Posteriormente, y según la ecuación (4.5), partiendo de la raíz

cuadrada de la polarizabilidad, se obtiene el valor proporcional al número de células colectadas para cada frecuencia conforme se varían los parámetros eléctricos dentro de unos límites razonables establecidos.



Figuras 4.5. Ajustes de los datos experimentales de la colección dielectroforética de las bacterias (a) *E. coli* y (b) *Staph. aureus*.

La bondad del ajuste realizado, una vez extraídas las características dieléctricas de las bacterias, se establece por medio de la función Chi-cuadrado reducida como guía cuantitativa. Las curvas de ajuste de los espectros de la *E. coli* y del *Staph. aureus* se obtienen con valores para la Chi-cuadrado de 0.11 y 1.23 respectivamente, siendo analizado en el caso del *Staph. aureus* el intervalo de frecuencias de 100 kHz a 35 MHz, y descartando el punto experimental a 10 MHz, por ser estimado como un error en el proceso experimental de origen incierto.

En la Tabla 4.1 se recogen los valores de ϵ y σ para cada uno de los distintos compartimentos de la *E. coli* y del *Staph. aureus* obtenidos en base a la estimación teórica de su respuesta DEP, junto con los valores extraídos por otros autores para estos microorganismos. El rango de incertidumbre de cada parámetro se estableció modificando el valor del parámetro hasta que la curva teórica cruza el límite de una de las barras de error estándar, siguiendo el método descrito en el trabajo de Hughes (Hughes *et al* 2002). Aún cuando los valores para la conductividad de las membranas plasmática y externa presentan un amplio rango de valores posibles —permaneciendo por debajo de un valor adecuado para estas capas—, en general, la sensibilidad del ajuste a las variaciones de los parámetros es aceptable. La dependencia frecuencial de dichos parámetros a nivel microscópico en el rango de las frecuencias consideradas —entre 10 kHz y 30 MHz— es debida únicamente al efecto de relajación interfacial Maxwell-Wagner, por lo que pueden ser consideradas magnitudes constantes.

<i>Escherichia coli</i>						
	<i>Asami (1980b)</i>		<i>Suehiro (2003)</i>		<i>Valores ajuste</i>	
	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)
Citoplasma	61	0.19	60	0.1	70 ± 10	0.07 ± 0.1
Membrana	10.8	$5\cdot10^{-8}$	10	$5\cdot10^{-8}$	10 ± 0.5	$<1.5\cdot10^{-6}$
Pared	60	0.68	60	0.5	60	0.5 ± 0.1
Membrana externa	—	—	—	—	10 ± 1	$(2\pm1)\cdot10^{-6}$
Medio externo	80	0.121	80	$2\cdot10^{-4}$	80	$2.7\cdot10^{-3}$

<i>Staphylococcus aureus</i>				
	<i>Johari (2003)</i>		<i>Valores ajuste</i>	
	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)
Citoplasma	<i>Insens</i>	0.2	70 ± 10	0.8 ± 0.05
Membrana	4.5	$5\cdot10^{-8}$	16 ± 0.5	$<1.5\cdot10^{-6}$
Pared	<i>Insens</i>	0.3	60 ± 0.5	0.5 ± 0.1
Medio externo	80	$1\cdot10^{-3}$	80	$2.5\cdot10^{-3}$

Tabla 4.1. Parámetros dieléctricos de la *E. coli* y del *Staph. aureus*, obtenidos mediante el ajuste del espectro de la colección DEP. A modo comparativo se recogen los valores encontrados en la literatura para la *E. coli* y el *Staph. epidermidis*, siendo esta última muy similar al *Staph. aureus* con el que se realiza la comparación. La permitividad y la conductividad del medio externo son fijadas experimentalmente.

Conforme a las figuras 4.5 (a) y (b), en el rango de bajas frecuencias existe una clara desviación entre teoría y experimento, especialmente en el caso del *Staph. aureus*. Entre las posibles causas de estas diferencias está el hecho de que en el rango más bajo de frecuencias – entre 10 kHz y 100 kHz– se da la dielectroforesis negativa, originando la acumulación de bacterias sobre la superficie de los electrodos. Esta concentración de células en las condiciones experimentales de baja conductividad en las que se opera debe ser poco significativa, pero dependiente de las diferencias dieléctricas entre aquéllas y el medio. De este modo se explica que la aparente colectividad del *Staph. aureus* por debajo de 60 kHz sea algo mayor que la de la *E. coli*. No obstante, no hay que descartar que, aunque se haya eliminado el remanente introducido por el flujo continuo de bacterias a través de la cámara, la pequeña variabilidad en el número de bacterias que pasan sobre los electrodos pueda introducir errores en la cuantificación de la colección en cada frecuencia. Otras posibles razones de dicha diferencia son la influencia de la polarización de los electrodos y la presencia del efecto de dispersión α —que, asociada a la doble capa iónica, se da a frecuencias por debajo de los kHz—no incluidas en el presente modelo.

Los valores de la conductividad y permitividad de los diferentes compartimentos de las bacterias deducidos mediante nuestro método están, en general, en acuerdo con los valores encontrados en la bibliografía sobre las bacterias. Sin embargo, el método empleado en este

estudio y los empleados en trabajos previos sobre la caracterización bacteriana presentan considerables diferencias. En primer lugar, el método aquí presentado permite una rápida evaluación de la muestra de bacterias u otras células, con una posible integración del dispositivo en los sistemas *lab-on-a-chip* con propósitos clínicos o de investigación. Igualmente, nuestro modelo supone una mejora frente al trabajo realizado por Johari (Johari *et al* 2003) y Suehiro (Suehiro *et al* 2003), tanto en el aspecto teórico como en el experimental. Johari emplea un sistema de electrodos creados con agujas, cuantifica la colección de partículas por inspección visual y no asume ningún modelo para la colección de bacterias. Simplemente considera la colección proporcional a la fuerza dielectroforética. Por su parte, Suehiro emplea electrodos interdigitados y considera el número de partículas colectadas proporcional a la impedancia medida entre los electrodos, lo que supone una aproximación tosca. Nuestro montaje consiste en una cámara de microelectrodos a través de la cual recircula la suspensión celular y un método de conteo directo mediante un sistema de análisis de imagen. En el aspecto teórico, se ha establecido un modelo que relaciona el número de partículas colectadas con la polarizabilidad de la bacteria, además de una simulación más real de la geometría de la célula, permitiendo así una mejor caracterización. Nuestro modelo para la *E. coli*, con tres capas y forma de bastón, es más real que los modelos empleados anteriormente por Asami *et al* (Asami *et al* 1980) y Suehiro *et al*. (Suehiro *et al* 2003), basados en partículas esféricas o elipsoidales con capa confocal. Las características dieléctricas obtenidas para la membrana externa, una muy baja conductividad de $2 \cdot 10^{-3}$ mS/m y una permitividad relativa de 10, son valores consistentes con el carácter de barrera permeable y su naturaleza bilipídica. Respecto a las diferencias de la caracterización entre ambas especies, se ha obtenido una mayor conductividad interna para el *Staph. aureus* que para la *E. coli*, en concordancia con el hecho de que las bacterias gram-positivas tienen un mayor contenido en iones K^+ que las gram-negativas.

Por otro lado, nuestro modelo para el *Staph. aureus*, una esfera con doble capa, es similar al modelo empleado por Johari *et al.* para el *Staph. epidermidis*, otra bacteria gram-positiva similar al *Staph. aureus*. Sin embargo, de forma contraria a los resultados presentados por Johari, nuestro ajuste es sensible a las variaciones de todos los parámetros, y hay una considerable diferencia entre los valores obtenidos para la conductividad del citoplasma y de la pared. Estas discrepancias pueden ser también debidas a los diferentes modelos empleados, así como a la diferente patogenicidad entre las especies que podría quedar reflejada en sus respectivas propiedades eléctricas. De hecho, es sabido que el *Staph. aureus* es más patógeno que *Staph. epidermidis*, y que la patogenicidad bacteriana está asociada, como se mencionó con anterioridad, a las propiedades de la pared celular (Antelmann *et al* 2002; Hecker *et al* 2003).

4.4.2. DETECCIÓN DE LA ACCIÓN ANTIBIÓTICA

Conocida la acción de la ampicilina y de la estreptomicina sobre las cepas de la *E. coli* y del *Staph aureus*, dos son los objetivos inicialmente planteados en este punto:

- evaluación DEP para un test rápido de la susceptibilidad antibiótica
- evaluación DEP de la sensibilidad a un antibiótico de una cepa determinada.

Sobre el segundo punto se sigue trabajando en la actualidad, por lo que a falta de completar el estudio, los resultados serán presentados en una futura publicación.

A. Evaluación rápida de la sensibilidad antibiótica.

A diferencia del método tradicional de obtención de los antibiogramas, en los que la bacteria se expone directamente a la acción de varios antibióticos en presencia de nutrientes durante unas 16h, el método planteado pretende analizar las posibilidades que ofrece la DEP en combinación con el modelo desarrollado para la detección de la acción del antibiótico sin esperar a crecer la bacteria en presencia del agente químico. Una vez conseguida la muestra para el análisis DEP, ésta se suspende directamente en agua desionizada (muestra control) a la que después se añade las cantidades de antibiótico, establecidas según el tipo de bacteria y el antibiótico conforme al protocolo indicado en el apartado 4.2.1. De esta manera se procede para la obtención de los espectros DEP de la *E.coli* y del *Staph. aureus* expuestas a seis antibióticos distintos.

Los primeros resultados de las respuestas DEP tras los tratamientos a las dosis CMI con las que se consigue la acción bacteriostática o bactericida de los antibióticos, no reflejaban los cambios esperados. Alternativamente se procedió a aumentar la concentración del antibiótico aplicado a las muestras bacterianas buscando inducir variaciones significativas en su respuesta, ajustando siempre la conductividad del medio externo alrededor de los 2.5 mS/m. Bajo las nuevas condiciones experimentales, los espectros DEP presentan comportamientos diversos frente a cada uno de los distintos antibióticos, lo que dificulta la sistematización de los resultados. Posiblemente, la baja absorción de antibiótico por parte de las bacterias cuando estas no se encuentran fase de crecimiento o en un medio del que extraer los nutrientes necesarios, como es el caso del medio acuoso en el que son suspendidas, han resultado determinantes. Por otro lado, otros factores no controlados, como los cambios de forma o tamaño, han podido influir en el comportamiento dielectroforético registrado. Por tanto, sería necesario un seguimiento más detallado del estado de la bacteria en cada uno de los experimentos, que pudiera dar pistas sobre las variaciones obtenidas, aún cuando tal requisito supusiera una mayor complejidad en la extracción de los datos. Se ha elaborado, no obstante, el análisis del comportamiento dielectroforético de uno de los casos observados. Aplicando el modelo teórico desarrollado, incluyendo posibles cambios morfológicos, intentamos extraer los parámetros dieléctricos con el propósito de tratar de entender qué ocurre en las bacterias en estas condiciones experimentales. El punto de atención se dirige ahora sobre la respuesta dielectroforética de la *E. coli* en suspensión acuosa y en presencia de ampicilina. Las primeras dosis empleadas son los límites del rango de su CMI correspondiente -2 y $8 \mu\text{g/ml}$ —aumentando la dosis hasta de ampicilina $20 \mu\text{g/ml}$. En la Figura 4.6 se muestran las respuestas DEP obtenidas junto con la curva de control ajustada en el apartado anterior. A primera vista se observa una mayor colectividad de las bacterias cuando se añade el antibiótico al medio, si bien el comportamiento de la suspensión no parece ser muy dependiente de la dosis empleada,

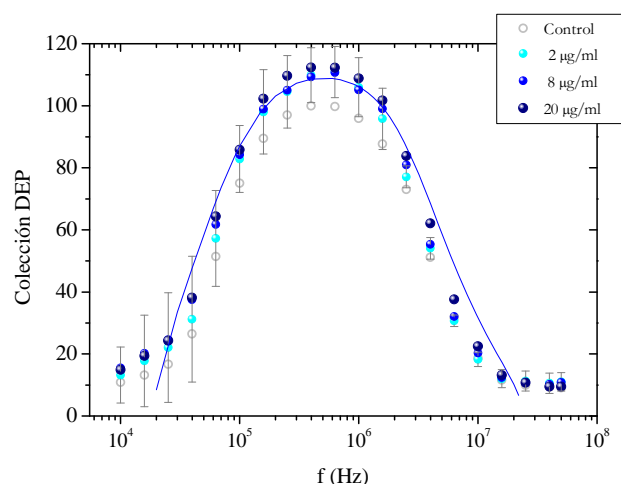


Figura 4.6. Respuestas experimentales de la *E. coli* suspendida en agua destilada en presencia de distintas dosis de ampicilina. La línea continua muestra el comportamiento teórico de la bacteria al aumentar la conductividad de la pared hasta 1.2 S/m, frente al valor de 0.5 S/m extraído de la curva de control, según se recogió en la tabla 4.1. (Por razones de claridad, sólo se muestran las barras de error de la respuesta a la dosis de 2 µg/ml).

dada la escasa diferencia observada según las distintas dosis. La mayor polarizabilidad del microorganismo en estas condiciones podría explicarse en base a un aumento del contenido iónico en la bacteria. Gracias al proceso de difusión por el cual las moléculas polares del antibiótico entran en la célula, éstas llegan a unirse a las proteínas PBPs, aumentando la conductividad del espacio periplásmico. Bajo tales supuestos, la curva teórica más próxima a la experimental se ha obtenido para un valor de la conductividad del espacio periplásmico de 1.2 S/m, manteniendo el resto de los parámetros dieléctricos sin alteraciones respecto a los presentados para la suspensión control de la tabla 4.1. La bondad del ajuste de la curva teórica a las distintas dosis varía desde 0.75 para la de 2 µg/ml hasta a 1.62 para la de 20 µg/ml, según se muestra en la Tabla 4.2. Podría decirse que para la dosis del límite inferior de la MIC

Ampicilina (µg/ml)	σ_{pp} (S/m)	χ^2
2	1.2	0.75
8	1.2	0.97
20	1.2	1.62

Tabla 4.2. Bondad del ajuste a través del parámetro chi-cuadrado, χ^2 , de la respuesta DEP teórica de la figura 4.6, obtenida al aumentar la conductividad del espacio periplásmico σ_{pp} a 1.2 S/m, frente al valor $\sigma_{pp} = 0.5$ S/m estimado para la muestra control (el resto de parámetros permanecen inalterados respecto a control).

se ha conseguido un buen ajuste y, por tanto, una buena caracterización dieléctrica de la bacteria, aunque no podría afirmarse lo mismo para su respuesta en presencia de 20 µg/ml de ampicilina –dado que supera el valor de 1.5 establecido como límite superior para el rango de valores que toma χ^2 cuando se logra un buen ajuste–.

Aproximarse a los valores más altos de la colección dielectroforética presupone un elevado valor para la pared de la bacteria –1.2 S/m frente a 0.5 S/m obtenido por nuestro modelo para la muestra control, contrastado a su vez con los valores deducidos por Asami y Suehiro, tal y como se puede ver en la tabla 4.1–. En cambio, otras caracterizaciones dieléctricas de la *E. coli* presentadas separadamente por Holzel (Holzel 1999) y Bai (Bai *et al* 2006) indican conductividades para el compartimento periplásmico en el rango de 2.2 a 11.8 S/m, bajo el supuesto de que σ_{pp} es aproximadamente igual a $31 \cdot \sigma_{ext}^{0.4}$ (relación obtenida empíricamente). Sin embargo, en las condiciones experimentales de nuestro estudio, esto equivaldría a que $\sigma_{pp} = 2.8$ S/m en todos los casos, dado que la conductividad del medio externo se mantiene próxima a 2.5 mS/m para evitar la dependencia de los resultados de este parámetro experimental. Este argumento lo encontramos suficientemente válido como para descartar los valores tan altos propuestos por Holzel y Bai. No obstante, cabe añadir un par de aclaraciones que acrecientan la validez de nuestra hipótesis, y por ende, de nuestro modelo. La primera, con el fin de despejar toda duda, confirma que aumentar la conductividad de la pared por encima de 1.2 S/m supone un desplazamiento del espectro DEP hacia altas frecuencias, desviándose de la respuesta experimental, como se aprecia en la Figura 4.7. Y la segunda, que

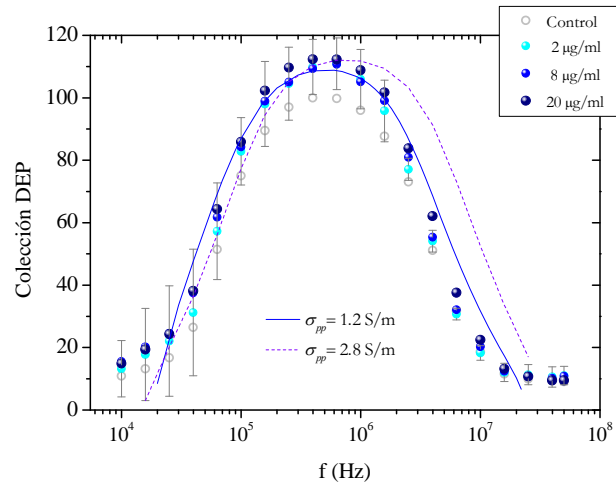


Figura 4.7. Comportamiento de la curva teórica de la *E. coli* suspendida en agua destilada en presencia de distintas dosis de ampicilina frente a un aumento de la conductividad del espacio periplásmico σ_{pp} hasta 2.8 S/m –según la relación $31 \cdot \sigma_{ext}^{0.4}$ –. La variación de σ_{pp} implica una desviación respecto a los resultados experimentales en el rango de frecuencias altas del espectro.

a pesar de que un aumento de la conductividad del citoplasma podría provocar cambios similares en el comportamiento DEP de la bacteria –ya que afecta también el espectro en la zona de frecuencias más altas–, es sabido que la ampicilina atraviesa la cápsula externa y queda retenida en el peptidoglicano por las proteínas receptoras de penicilina PBPs, lo que hace poco probable que el antibiótico alcance el citoplasma y varíe su contenido iónico.

Tras la argumentación presentada, y dado que el mejor valor de chi-cuadrado obtenido es de 0.75 –frente al 0.11 resultante de la curva control de la *E. coli*– tras un incremento de σ_{pp} que no ha provocado los resultados buscados, se ha contrastado el análisis anterior con la posibilidad de que las bacterias se encontraran en una situación de no crecimiento aparente cuando fueron suspendidas en agua destilada. Aunque el crecimiento de la bacteria se detiene tras la fase de crecimiento exponencial, en la que se multiplica la concentración de bacterias en el cultivo, existe un corto intervalo de tiempo previo en el que las hidrolasas –encargadas de romper los enlaces de peptidoglicano de la pared para permitir el crecimiento– siguen actuando. De este modo, podría darse la conocida filamentación de la bacteria implicando un alargamiento del microorganismo, lo que claramente supondría un aumento de su polarizabilidad. En la Figura 4.8 se presentan la colección DEP después de que la bacteria haya aumentado su longitud un 13% respecto a su longitud en la muestra de control. Así, y como se recoge en la Tabla 4.3, sin variar los parámetros dieléctricos extraídos para la suspensión control de la *E. coli*, se consigue un mejor ajuste con valores de χ^2 entre 0.33 y 0.88.

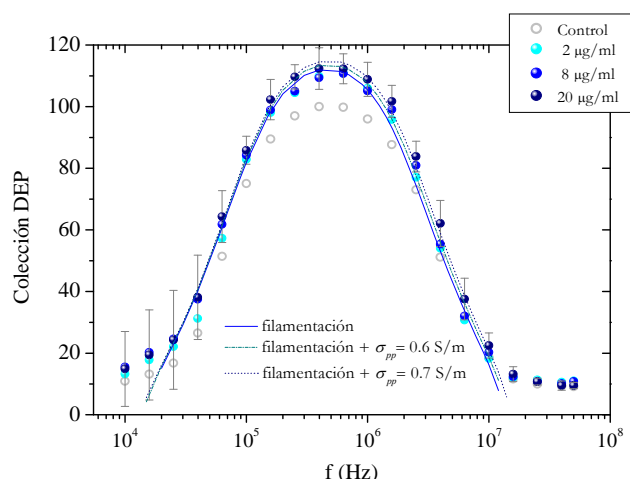


Figura 4.8. Ajustes de las respuestas DEP de las suspensiones de *E. coli* en presencia de ampicilina. A partir de los parámetros dieléctricos y estructurales de la suspensión control, se han obtenido los espectros teóricos (a) aumentando la longitud de la bacteria en un 13% –línea continua azul–; (b) aumentando además la conductividad del espacio periplasmático a 0.6 S/m –línea de guiones y puntos; o (c) a 0.7 S/m –línea de puntos–. (En esta gráfica se presentan únicamente las barras de error de la respuesta de la bacteria a la dosis de 20 µg/ml).

Ampicilina ($\mu\text{g/ml}$)	%L	σ_{pp} (S/m)	χ^2
2	13	0.5	0.33
2	13	0.6	0.11
8	13	0.5	0.32
8	13	0.6	0.22
20	13	0.5	0.88
20	13	0.6	0.40
20	13	0.7	0.16

Tabla 4.3. Bondad de los ajustes a través del parámetro chi-cuadrado, χ^2 , de la respuesta DEP teórica de la figura 4.8. Ahora se considera que la bacteria se ha alargado un 13% respecto a la longitud considerada en el ajuste de la muestra de control. El valor de la conductividad del espacio periplásmico, σ_{pp} , se varía ligeramente hasta encontrar el mejor ajuste determinado por el menor valor de χ^2 . (Al igual que en la tabla 4.2, los parámetros no presentados permanecen con los valores obtenidos a partir de la muestra control)

Sin embargo, no puede descartarse que, conjuntamente con el alargamiento de la bacteria, la ampicilina penetre hasta el espacio periplásmico por el mismo efecto descrito anteriormente. De este modo, se han considerado ligeros aumentos de la conductividad de dicho compartimento celular, mostrados también en la figura 4.8 en líneas discontinuas: las respuestas DEP calculadas de la bacteria en tales condiciones se aproximan en mayor grado a las experimentales. Dicha mejora supone un aumento del valor de σ_{pp} desde 0.5 S/m hasta 0.7 S/m, para los que además la bondad del ajuste alcanza los valores de χ^2 entre 0.11 y 0.22, conforme se muestra en la misma tabla 4.3. En base a los resultados, a pesar del pequeño incremento de σ_{pp} , la hipótesis de la alteración del espacio periplásmico por la presencia de las moléculas de ampicilina en el medio externo, trabaja acorde con los resultados experimentales. Muestra además, que la mayor dosis de ampicilina en el medio –20 $\mu\text{g/ml}$ – puede implicar a su vez una ingesta superior de antibiótico, reflejado en el mayor valor de σ_{pp} con el que se ajusta la respuesta de la bacteria a dicha dosis.

4.5. CONCLUSIONES

Como se ha descrito, la combinación de la medida del espectro de la colección dielectroforética de una suspensión bacteriana y su interpretación teórica puede emplearse para la obtención de las propiedades eléctricas de bacterias. Se han caracterizado los diferentes compartimentos celulares del *Staph. aureus* y la *E. coli*, y en base a ella se ha podido establecer una relación con algunas de sus características fisiológicas, tales como el contenido iónico del interior celular o la patogenicidad de la especie. El conocimiento de tales características ayuda a la clasificación gram de las bacterias, trabajo que supone un primer acercamiento al diagnóstico y, por tanto, al tratamiento de las infecciones causadas bien por las bacterias gram-positiva –como el *Staph. aureus*– o bien por las gram-negativa –como la

E. coli-. Un paso más en el campo de la microbiología aplicada consistiría en lograr la rápida identificación mediante DEP no sólo de la bacteria, sino de la acción bactericida de los antibióticos sobre ésta. Debido a planteamientos no suficientemente completos del estudio experimental para la colección DEP de las bacterias bajo la acción antibiótica, no han podido presentarse todas las posibilidades de la DEP para el análisis de dicho aspecto concreto. No obstante, sí se ha mostrado la potencialidad del modelo DEP como herramienta analítica cuando se ha propuesto esclarecer el comportamiento de la *E. coli* en presencia de ampicilina, aún cuando el antibiótico no ejerciera su función bactericida.

Frente a los métodos empleados en otros trabajos, nuestro método presenta algunas ventajas como el sistema de microfluidos y microelectrodos empleado para una medida automatizada del espectro DEP, y sobre todo, un modelo más preciso, tanto en la modelización de la estructura celular como en el establecimiento de la relación entre la colección de células recogidas y su polarizabilidad.

De esta manera, los dos análisis presentados pueden ayudar a su vez a la reducción de la generación de resistencias antibióticas en las bacterias, originadas en ocasiones por tratamientos preventivos asignados a los pacientes a la espera del tratamiento adecuado una vez se haya identificado el agente bacteriano que ha causado la enfermedad. A su vez, los otros estudios proyectados, como el de la detección dielectroforética de la acción de los antibióticos sobre las bacterias en plazos de tiempo menores que los exigidos por los antibiogramas convencionales, o el de la diferenciación mediante dielectroforesis de la sensibilidad o resistencia de una cepa determinada a un antibiótico específico, complementarían enormemente el trabajo llevado a cabo. Igualmente, una identificación selectiva de las células biológicas, a través de una base de datos previamente definida de los parámetros dieléctricos, supondría un gran avance en dicho contexto. Éstas son futuras líneas de trabajo e investigación sobre las que se volcará nuestro trabajo, junto con la aplicación de la dielectroforesis como método rápido y no invasivo para la medida de contaminantes ambientales usando células biológicas modelo sometidas a las muestras de agua a analizar.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Allsopp DWE, Milner KR, Brown AP y Betts WB (1999). *Impedance Technique for Measuring Dielectrophoretic Collection of Microbiological Particles*. Journal of Physics D-Applied Physics 32(9): 1066-1074.
- Antelmann H, Yamamoto H, Sekiguchi J y Hecker M (2002). *Stabilization of Cell Wall Proteins in Bacillus Subtilis: A Proteomic Approach*. Proteomics 2(5): 591-602.
- Asami K, Hanai T y Koizumi N (1980). *Dielectric Analysis of Escherichia Coli Suspensions in the Light of the Theory of Interfacial Polarization* Biophys. J. 31: 215-228.
- Bai W, Zhao KS y Asami K (2006). *Dielectric Properties of E. Coli Cell as Simulated by the Three-Shell Spheroidal Model*. Biophysical Chemistry 122(2): 136-142.
- Brown AP, Betts WB, Harrison AB y O'Neill JG (1999). *Evaluation of a Dielectrophoretic Bacterial Counting Technique*. Biosensors & Bioelectronics 14(3): 341-351.
- Castellarnau M, Errachid A, Madrid C, Juarez A y Samitier J (2006). *Dielectrophoresis as a Tool to Characterize and Differentiate Isogenic Mutants of Escherichia Coli*. Biophys. J. 91(10): 3937-3945.
- Foster KR y Sowers AE (1995). *Dielectrophoretic Forces and Potentials Induced on Pairs of Cells in an Electric Field*. Biophys. J. 69(3): 777-784.
- Gheorghiu E y Asami K (1998). *Monitoring Cell Cycle by Impedance Spectroscopy: Experimental and Theoretical Aspects*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45(2): 139-143.
- Gimsa J y Wachner D (1999). *A Polarization Model Overcoming the Geometric Restrictions of the Laplace Solution for Spheroidal Cells: Obtaining New Equations for Field-Induced Forces and Transmembrane Potential*. Biophysical Journal 77(3): 1316-1326.
- Hecker M, Engelmann S y Cordwell SJ (2003). *Proteomics of Staphylococcus Aureus - Current State and Future Challenges*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 787(1): 179-195.
- Hinds W (1999). *Aerosol Technology: Properties, Behaviour and Measurements of Airborne Particles*. New York.
- Hoettges KF, Dale JW y Hughes MP (2007). *Rapid Determination of Antibiotic Resistance in E. Coli Using Dielectrophoresis*. Physics in Medicine and Biology 19: 6001.
- Holzel R (1999). *Non-Invasive Determination of Bacterial Single Cell Properties by Electrorotation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research 1450(1): 53-60.
- Huang Y, Holzel R, Pethig R y Wang X-B (1992). *Differences in the Ac Electrodynamics of Viable and Non-Viable Yeast Cells Determined through Combined Dielectrophoresis and Electrorotation Studies*. Physics in Medicine and Biology 37(7): 1499-1517.

- Hughes MP, Morgan H y Rixon FJ (2002). *Measuring the Dielectric Properties of Herpes Simplex Virus Type 1 Virions with Dielectrophoresis*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1571(1): 1-8.
- Johari J, Hubner Y, Hull JC, Dale JW y Hughes MP (2003). *Dielectrophoretic Assay of Bacterial Resistance to Antibiotics*. Physics in Medicine and Biology 48(14): N193-N198.
- Jones TB (1995). *Electromechanics of Particles*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Lapizco-Encinas BH, Simmons BA, Cummings EB y Fintschenko Y (2004). *Dielectrophoretic Concentration and Separation of Live and Dead Bacteria in an Array of Insulators*. Analytical Chemistry 76(6): 1571-1579.
- Lee S-W y Tai Y-C (1999). *A Micro Cell Lysis Device*. Sensors and Actuators A: Physical 73(1-2): 74-79.
- Markx GH, Dyda PA y Pethig R (1996). *Dielectrophoretic Separation of Bacteria Using a Conductivity Gradient*. Journal of Biotechnology 51(2): 175-180.
- Markx GH, Huang Y, Zhou XF y Pethig R (1994). *Dielectrophoretic Characterization and Separation of Microorganisms*. Microbiology-UK 140: 585-91.
- Milner KR, Brown AP, Allsopp DWE y Belts WB (1998). *Dielectrophoretic Classification of Bacteria Using Differential Impedance Measurements*. Electronics Letters 34(1): 66-68.
- Nayfeh MH y Brussel MK (1985). *Electricity and Magnetism*. New York.
- Pohl HA (1978). *Dielectrophoresis the Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields*. Cambridge.
- Quinn CM, Archer GP, Betts WB y O'Neill JG (1995). *An Image Analysis Enhanced Dielectrophoretic Analysis of Chlorine and Ozone Treated Cryptosporidium Parvum Oocysts. In Protozoan Parasites and Water* on Protozoan Parasites and Water. C D Betts W. B., Fricker C., Smith H. V. & Watkins J. Cambridge, The Royal Society of Chemistry. pp. 125-132.
- Sancho M, Martinez G y Martin C (2003). *Accurate Dielectric Modelling of Shelled Particles and Cells*. Journal of Electrostatics 57(2): 143-156.
- Sekine K, Torii N, Kuroda C y Asami K (2002). *Calculation of Dielectric Spectra of Suspensions of Rod-Shaped Cells Using Boundary Element Method*. Bioelectrochemistry 57(1): 83-87.
- Suehiro J, Hamada R, Noutomi D, Shutou M y Hara M (2003). *Selective Detection of Viable Bacteria Using Dielectrophoretic Impedance Measurement Method*. Journal of Electrostatics 57(2): 157-168.
- Suehiro J, Yatsunami R, Hamada R y Hara M (1999). *Quantitative Estimation of Biological Cell Concentration Suspended in Aqueous Medium by Using Dielectrophoretic Impedance Method*. Journal of Physics D-Applied Physics 32(21): 2814.

Capítulo 5

EFFECTOS DE INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS

Conocidos los efectos de interacción entre partículas que acompañan a los fenómenos electrocinéticos, se ha empleado el método numérico desarrollado para evaluar este comportamiento y sus posibles implicaciones en diversas situaciones. Partiendo del análisis básico de la fuerza de atracción entre partículas polarizadas de diversos tamaños y geometrías, se llega al estudio de la formación de agregados de glóbulos rojos en el flujo sanguíneo y la influencia de los efectos de la formación de cadenas en el comportamiento dielectroforético de linfocitos.

5.1. INTRODUCCIÓN

Una partícula polarizada bajo la acción de un campo eléctrico externo genera a su vez otro campo que afecta a las partículas próximas, provocando, en caso de que éstas sean más polarizables que el medio en el que se encuentran, la atracción mutua entre ellas. De acuerdo con las observaciones experimentales, en los procesos dielectroforéticos la formación de cadenas o *pearl-chaining* es un hecho común dependiente de la intensidad y la frecuencia del campo aplicado, la conductividad del medio en el que se encuentran suspendidas las partículas, y las características eléctricas de las mismas. Estas formaciones se disponen a lo largo de las líneas de campo tal y como se aparece en la imagen de la Figura 5.1, recogida en un proceso experimental llevado a cabo en nuestro laboratorio –las partículas bajo dielectroforesis son levaduras cedidas por el departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la UCM–.

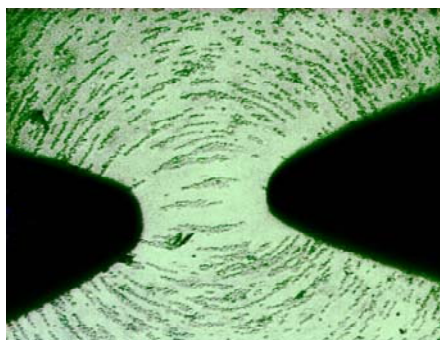


Figura 5.1 Levaduras sometidas al fenómeno dielectroforético creado por un campo eléctrico entre dos puntas de aguja enfrentadas –separadas entre sí 300 μm – a las que se les aplica un voltaje de 10 Vpp a una frecuencia de 120 kHz.

La complejidad del fenómeno, que ha de incluir numerosas interacciones entre partículas dieléctricas, hace que su estudio teórico haya sido por lo general poco tratado. En los primeros análisis en los que se consideraba la formación de cadenas celulares, no se estudiaban sus causas sino que, simplemente a partir de las cadenas, se recurría al conteo de la colección dielectroforética. Esta fue la táctica seguida por Crane y Pohl, quienes estimaban las células colectadas, dispuestas en una cadena celular que ocupa un volumen cilíndrico, a través del ángulo sólido subtendido desde el punto de anejió hacia el centro de los electrodos (Crane y Pohl 1972) En trabajos posteriores la formación de cadenas se ha estudiado con diversos enfoques que intentan explicar y llegar a una mejor comprensión del fenómeno y de sus factores originarios. Desde el punto de vista energético, Sancho (Sancho *et al* 1997) llevó a cabo un análisis de la interacción entre las partículas y de los factores influyentes en el equilibrio de la formación de las estructuras lineales empleando el método de Monte Carlo: las simulaciones realizadas presentaban un buen acuerdo con la observación experimental de

la formación de cadenas de la levadura *Neurospora Crassa*. Además pudieron determinar la intensidad de campo umbral a partir del cual se daba la formación de cadenas celulares. Ampliando este estudio, Llamas (Llamas *et al* 1998) tuvo en cuenta los efectos dinámicos para analizar la evolución de la suspensión bajo el campo eléctrico, considerando la viscosidad del medio, las fuerzas estocásticas brownianas –las colisiones de las moléculas del medio líquido externo– y la interacción eléctrica entre las partículas polarizadas y los electrodos. Todo ello es analizado a través de un método numérico que integra la ecuación de Lagenvin que rige la dinámica del problema. A partir del estudio se evaluó la influencia de los parámetros dieléctricos de las células y del medio externo sobre la longitud media de cadenas, proponiendo dicha medida como método de caracterización eléctrica de las células individuales. Sin embargo, en ambos trabajos sólo fue considerada la interacción dipolar, es decir, un primer término del desarrollo multipolar general de la distribución de carga inducida en las interfases de la partícula.

La aproximación dipolar es de hecho uno de los métodos más empleados para el análisis del problema, ya que proporciona una primera estimación de la fuerza entre partículas polarizadas interaccionando bajo el campo eléctrico. Pero a pesar de su fácil aplicación, la aproximación dipolar no tiene en cuenta la interacción de los momentos multipolares de mayor orden o los efectos locales por presencia de múltiples partículas distorsionando a su vez el campo (Klingenberg *et al* 1991a). Con el fin de superar estas limitaciones, varios trabajos basaron su análisis en la teoría multipolar (Clerc y Bossis 1993), en el modelo dipolo-dipolo inducido (Yu y Wan 2000), en el método de las imágenes múltiples (Siu *et al* 2001), mediante distintas aproximaciones numéricas (Davis 1992) o mediante técnicas de simulación de dinámica molecular (Tan *et al* 1999). Todos estos métodos han proporcionado una mayor aproximación entre los resultados teóricos y los experimentales –llevados a cabo mayoritariamente con partículas dieléctricas artificiales–, aunque no siempre resultan de fácil empleo, o son poco apropiados para considerar la posibilidad de coexistencia de biopartículas de distintos tamaños –suspensiones polidispersivas– o considerar geometrías distintas de la esférica.

Las aplicaciones del método numérico desarrollado presentadas en este capítulo, en relación con la interacción de partículas polarizadas bajo el campo eléctrico, constituye uno de los campos de mayor interés dentro de la electrodinámica de partículas. La atención del estudio se centrará en los efectos que la forma, número o separación de las células provocan sobre la fuerza de interacción mutua, sobre su polarizabilidad u otras magnitudes derivadas, de interés para un mayor conocimiento de la fisiología y funcionalidad celular. Así, respecto a los eritrocitos o glóbulos rojos, entender el proceso que provoca su agregación requiere del conocimiento de varios factores, tales como la carga superficial de la célula, los efectos de los agentes externos que provocan la agregación y las tensiones mecánicas que se producen en la membrana. Los campos electromagnéticos de radiofrecuencia introducen una componente adicional energética negativa sobre la célula debido a la polarización inducida, de modo que favorece en cierta medida la formación del estado agregado de los eritrocitos conocido por ‘rouleau’. Mediante nuestro método computacional se ha modelado la célula como un elipsoide con una capa de espesor uniforme, y se ha calculado la carga inducida en sus interfases bajo un campo eléctrico de 1 V/m a 1.8 GHz –campo normalizado y frecuencia de portadora de

telefonía móvil— aplicado a lo largo del eje de apilación de las células. El tratamiento del problema se realiza a partir de consideraciones energéticas, teniendo en cuenta la energía de los momentos dipolares y la energía de interacción entre los dipolos inducidos sobre las células por el campo. El resultado muestra que, a pesar de la pequeña contribución del campo a la formación de estas estructuras, dicha contribución puede llegar a ser considerable en campos de alta intensidad, a cuyo cuadrado es proporcional la energía eléctrica de la formación.

El último estudio realizado sobre la interacción intercelular en experimentos dielectroforéticos tiene como objetivo la caracterización de otras células del sistema inmunológico, en concreto, los linfocitos conocidos por células-T. Los cambios morfológicos que sufren las membranas de estas células antes de la acción inmunológica pueden ser detectados en el espectro DEP por medio del parámetro característico de la frecuencia de cruce f_{xo} . Pero la detección de tales cambios a través de f_{xo} puede verse enmascarada por la formación de cadenas que se da bajo experimentación dielectroforética, y que al modificar el espectro, modifican también la f_{xo} dificultando de este modo la correcta identificación del estado de la célula a través del espectro. A partir del método detectaremos las implicaciones que tiene la formación de cadenas en el espectro DEP mediante la variación de la f_{xo} , procurando extraer la información correcta sobre la membrana celular de los linfocitos antes de su activación.

5.2. METODOLOGÍA

A partir del cálculo computacional de la densidad superficial de carga inducida sobre la célula, mediante el método desarrollado y expuesto en el capítulo 3, se ha visto cómo pueden extraerse otras magnitudes de interés. En base a la carga inducida, el promedio de la fuerza entre dos partículas dieléctricas bajo un campo eléctrico externo, teniendo en cuenta la interacción entre los elementos de carga de ambas partículas, puede evaluarse según la ecuación

$$\mathbf{F} = \frac{1}{2} \text{Re} \iint_{S_1 S_2} \tilde{\mathbf{K}}(\mathbf{r}) \tilde{\mathbf{K}}^*(\mathbf{r}') \nabla \frac{1}{4\pi\epsilon_{ext}} \left(\frac{1}{R} \right) ds ds' \quad (5.1)$$

donde $\tilde{\mathbf{K}}$ es la densidad de carga superficial en las interfases, ϵ_{ext} la permitividad del medio externo, $R = |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$ y S_1 y S_2 las interfases de las correspondientes partículas.

Desde el punto de vista energético, evaluar la tendencia de las partículas bajo experimentación dielectroforética a formar cadenas implica considerar que el sistema alcanza su equilibrio presentando un estado de mínima energía. La energía total del sistema puede obtenerse a partir de las contribuciones energéticas de las N partículas polarizadas bajo el campo externo y de la energía de interacción mutua entre ellas,

$$U = U_0 + \sum U_{ij} \quad (5.2)$$

donde U_0 es la energía total de los dipolos inducidos de cada partícula $\tilde{\mathbf{p}}_i$ en el campo externo,

$$U_0 = -\frac{1}{2} \text{Re} \sum_{i=1}^N \tilde{\mathbf{p}}_i \tilde{\mathbf{E}}^*, \quad (5.3)$$

mientras que el segundo sumando de (5.2) representa la contribución energética debida a la interacción mutua entre dipolos \mathbf{p}_i y \mathbf{p}_j , cuya expresión resulta

$$U_{ij} = \frac{1}{8\pi\epsilon_0} \left[\cos\varphi - 3\cos\theta_i \cos\theta_j \right] \text{Re} \left(\frac{\mathbf{p}_i \mathbf{p}_j^*}{r_{ij}^3} \right) \quad (5.4)$$

donde φ es el ángulo que forman los momentos dipolares de las partículas, y θ_i, θ_j son los ángulos que forman los respectivos momentos con el vector de posición \mathbf{r}_{ij} . A través de la polarizabilidad efectiva $\tilde{\alpha}$ que describe la respuesta eléctrica de la partícula en función de sus propiedades eléctricas y la frecuencia, se obtiene el momento dipolar según la relación $\tilde{\mathbf{p}} = \tilde{\alpha} \tilde{\mathbf{E}}$, de modo que

$$\tilde{\mathbf{p}} = 4\pi a^3 \tilde{\epsilon}_{ext} \left(\frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_{ext}}{\tilde{\epsilon}_p + 2\tilde{\epsilon}_{ext}} \right) \tilde{\mathbf{E}} \quad (5.5)$$

con $\tilde{\epsilon}_{ext}$ y $\tilde{\epsilon}_p$ las permitividades complejas del medio y de la partícula respectivamente, y a el radio de la partícula. Al estudiar el fenómeno *pearl-chaining* en suspensiones celulares, las células son modelizadas como partículas con una capa que representa la membrana. En tal caso, es necesario generalizar la ecuación (5.5) sustituyendo $\tilde{\epsilon}_p$ por la permitividad equivalente $\tilde{\epsilon}'_p$ que describa la partícula heterogénea, y que ya fue introducida en el capítulo 3 a través de la ecuación (3.4). Teniendo en cuenta la permitividad equivalente de cada célula y considerando que los momentos dipolares se encuentran alineados, tras una reordenación de términos en las contribuciones al total de la energía del sistema, a partir de las ecuaciones (5.3) y (5.4), resulta

$$U_0 = -2N\pi a^3 \text{Re}(\tilde{\epsilon}_{ext}) \text{Re} \left(\frac{\tilde{\epsilon}'_p - \tilde{\epsilon}_{ext}}{\tilde{\epsilon}'_p + 2\tilde{\epsilon}_{ext}} \right) E^2 \quad (5.6)$$

$$U_{ij} = 4\pi a^6 \left[\text{Re}(\tilde{\epsilon}_{ext}) \right]^2 \left| \frac{\tilde{\epsilon}'_p - \tilde{\epsilon}_{ext}}{\tilde{\epsilon}'_p + 2\tilde{\epsilon}_{ext}} \right|^2 \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^N \frac{1 - 3\cos^2 \theta_{ij}}{r_{ij}^3} E^2 \quad (5.7)$$

En base a este desarrollo teórico se ha analizado la formación de cadenas en suspensiones celulares teniendo en cuenta no sólo las propiedades dieléctricas del fluido y de las células, sino también la posible diversidad tanto en tamaño como en geometría entre las células interactuantes. Además se han evaluado, por un lado, la influencia del campo eléctrico sobre el apilamiento de glóbulos rojos en la sangre y los cambios que esta formación implica sobre el potencial transmembrana de la célula, y por otro, las variaciones del parámetro característico de la frecuencia de cruce cuando se observa el fenómeno *pearl-chaining*, con sus posibles implicaciones en el estudio DEP de los linfocitos T.

5.3. EFECTOS DE FORMA Y POLIDISPERSIÓN

Uno de los puntos más importantes en el estudio DEP de la interacción intercelular es la consideración de la diversidad de geometrías y/o tamaños de las células. Como se vió en el tercer capítulo, el método numérico permite un mayor acercamiento a la realidad geométrica de la célula, por lo que se ha podido llevar a cabo un estudio preliminar de la influencia de la forma en los efectos de interacción. Las desviaciones de las células respecto a la geometría esférica pueden ser más o menos importantes: por ejemplo, existen células elipsoidales –como múltiples bacterias– o células columnares –como algunas del tejido epitelial– o células bastón, cuya geometría consiste en un cilindro con extremos semiesféricos –como otras tantas bacterias y levaduras–. Estas diferencias geométricas que presentan las células sugiere plantear el análisis de la influencia de la forma en los fenómenos de polarización e interacción mutua. En una primera aproximación al problema, se han considerado las geometrías esférica, elipsoidal, cilíndrica y bastón, estableciendo como criterio que todas presenten un volumen igual al de la biopartícula esférica de radio R , y obteniendo las dimensiones características del resto de geometrías en base a éste. En la Figura 5.2 aparece la representación de cada geometría junto con sus semi-longitudes en función del radio de la esfera R : $A = 2.942R$, $H = 1.945R$ y $L = 2.144R$ para el elipsoide, cilindro y bastón respectivamente.

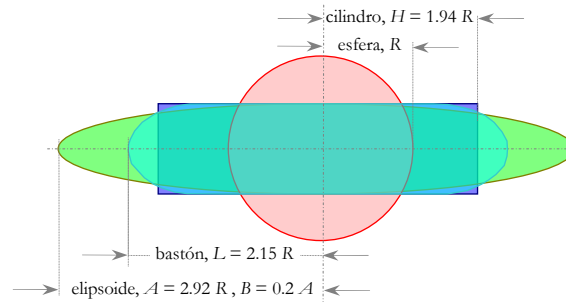


Figura 5.2. Representación gráfica bidimensional de las distintas geometrías consideradas en el estudio, junto con sus dimensiones relativas al radio de la esfera R .

Para evaluar la interacción entre dos partículas bajo la acción de un campo eléctrico externo E_0 aplicado longitudinalmente al eje que las une, se calcula la fuerza según la ecuación (5.1), y a la vez a modo comparativo, se calcula la fuerza obtenida según la aproximación dipolar. El primer cálculo se realiza para el caso de dos biopartículas esféricas de radios R y r , y el resultado se muestra en la Figura 5.3. La curva representa la fuerza interpartícula obtenida en función de la separación y de la relación de tamaño entre ambas. Puede observarse que, sobre todo cuando la distancia entre ellas es muy pequeña, la aproximación dipolar subestima los efectos de interacción debido a que desprecia la contribución de los momentos de mayor orden y los campos mutuamente inducidos.

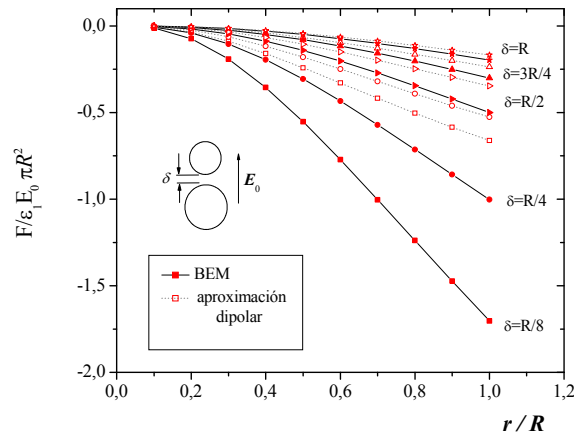


Figura 5.3. Fuerza de atracción normalizada entre esferas de permitividad ε_1 suspendidas en un medio de permitividad ε_2 —con $\varepsilon_1/\varepsilon_2 = 10$ — respecto a la relación de tamaños r/R , y para diversas distancias δ . Símbolos y líneas sólidos: resultados numéricos mediante BEM; símbolos huecos y líneas punteadas: estimación según aproximación del dipolo puntual.

Estos resultados han sido validados con los obtenidos previamente por Jones (Jones 1995) mediante expansiones truncadas de multipolos para el caso de partículas de igual diámetro, y que ha su vez fueron contrastados con valores obtenidos experimentalmente.

Observadas las diferencias encontradas entre los métodos empleados para el estudio de la interacción en el caso más general de biopartículas esféricas, se analiza a continuación el caso del modelo elipsoidal comúnmente empleado para células alargadas. La fuerza resultante entre dos elipsoides, cuya relación de semiejes se ha establecido como $b/a = c/a = 0.2$, aparece representada en la Figura 5.4(a). Comparando este resultado con el de la Figura 5.3, se observa que la magnitud normalizada de la fuerza entre partículas esféricas es, al menos, un orden mayor que la fuerza entre las partículas elipsoidales de igual volumen. Como geometrías alternativas a la elipsoidal para partículas alargadas, se ha supuesto la interacción entre partículas cilíndricas y con forma de bastón, conforme aparecen representadas en las Figuras 5.4(b) y (c), respectivamente, junto con los resultados obtenidos para la fuerza de atracción entre ellas. A partir de dichas gráficas se detecta la influencia de la geometría escogida para modelizar la célula alargada: la forma cilíndrica implica una interacción más fuerte entre las partículas, que llega a ser el doble que en el caso del modelo bastón, y hasta de un orden mayor que para el caso elipsoidal. En la Figura 5.4(d) se presenta el estudio comparativo de las fuerzas entre partículas de geometrías y tamaños idénticos frente a la distancia normalizada, resultando claramente predominante la interacción entre las esferas. Sin embargo, dado que la condición impuesta de igual volumen genera longitudes muy distintas con las que se ha normalizado la fuerza de interacción, es necesario señalar que si se calculan fuerzas absolutas, proporcionales al cuadrado de la semilongitud de la partícula, la relación cambia. Por ejemplo, las fuerzas entre dos partículas idénticas a una distancia normalizada de $1/8$, están en la proporción $1 : 1.14 : 0.88 : 0.22$ para la esfera, cilindro, bastón y elipsoide, respectivamente, resultando máxima la fuerza de interacción en el caso de las biopartículas columnares o cilíndricas.

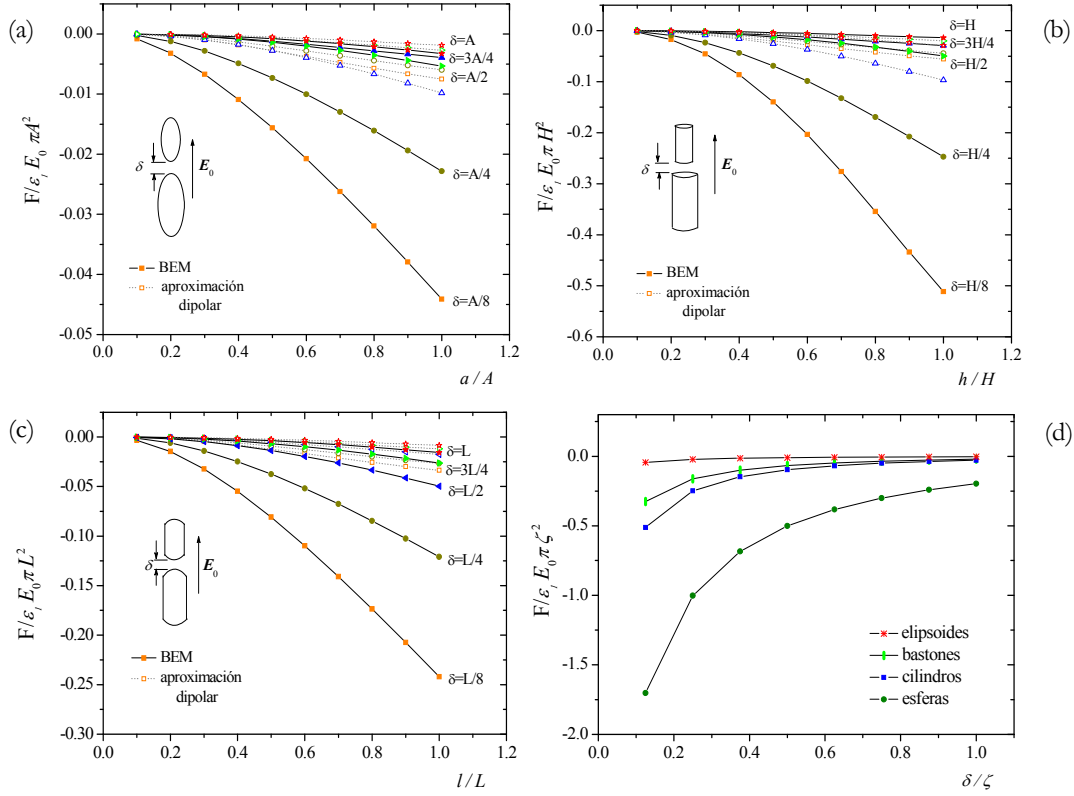


Figura 5.4. Fuerza de atracción normalizada entre diversos tipos de partículas alargadas con distintos tamaños, en los que la letra mayúscula se asocia a la dimensión de la partícula mayor y la minúscula a la menor. (a) elipsoides de semiejes A y a , (b) cilindros de semialtura H y h , (c) bastones de semilongitudes L y l . Símbolos sólidos y líneas continuas: resultados numéricos; símbolos huecos y líneas punteadas, predicción dipolo puntual. (d) Variación de la fuerza normalizada entre dos partículas idénticas de diferentes tipos respecto a su distancia δ , donde ζ representa genéricamente cada una de las semilongitudes.

Con el objetivo de profundizar un poco más en la influencia de la geometría sobre la polarización de las partículas y, consecuentemente, sobre su interacción, además de las tensiones locales en la superficie, se ha calculado la densidad de carga eléctrica inducida en las interfases entre partícula y medio externo. En la Figura 5.5 se muestra la variación de la carga superficial de polarización obtenida a lo largo de la interfase en función del ángulo polar según las distintas geometrías. En este caso se ha tomado la misma distancia absoluta entre los pares de biopartículas y, como puede observarse, las diferencias son significativas. La partícula elipsoidal presenta la mayor densidad de carga en el polo, debido a la mayor curvatura en este punto, mientras que el resto de geometrías presentan los valores esperables en consideración a la posible concentración de carga en función de la forma de las interfases. Así, al máximo de la geometría elipsoidal le siguen la forma de bastón, la esférica y finalmente la cilíndrica, si bien la densidad de carga de esta última presenta una singularidad en el punto de unión entre la base y la altura, como aparece en la gráfica.

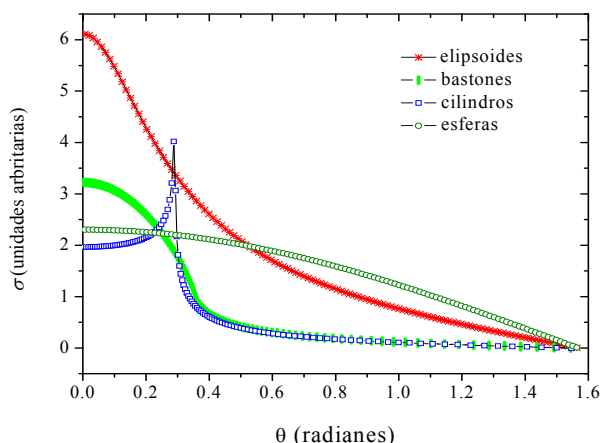


Figura 5.5. Densidad de carga superficial calculada en la interfase de la partícula-medio —con una diferencia dieléctrica $\epsilon_1/\epsilon_2=10$ — para las distintas formas, frente al ángulo en coordenadas polares. Se suponen dos partículas idénticas interactuando, separadas una distancia igual al semieje A del elipsoide.

5.4. AGREGACIÓN DE ERITROCITOS BAJO CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RF

Tras un primer análisis del problema genérico de interacción, la primera aplicación en el ámbito biológico se realiza en el campo de la reología del flujo sanguíneo. Un aspecto importante en dicho campo es el fenómeno de agregación de glóbulos rojos —a los que nos referiremos con el acrónimo RBC, proveniente del término inglés *red blood cell*— y su apilamiento originando la formación conocida por el término *rouleau*. Desde el punto de vista médico este fenómeno presenta un gran interés debido a su influencia sobre la viscosidad de la sangre, o su efecto en anormalidades hemorreológicas de algunas patologías. Además, en base a la formación de *rouleaux* se han estudiado las propiedades generales de las interacciones membrana-membrana de los eritrocitos, sabiendo que la formación de *rouleaux* se produce por adhesión lado con lado de un número determinado de células que depende de la energía de adhesión, la fuerza repulsiva entre células cargadas y las condiciones del flujo de la sangre, llegando a alcanzar longitudes de hasta 50 micras, con más de 20 células.

Las fuerzas de desagregación bajo condiciones normales del flujo sanguíneo son suficientemente intensas como para romper el *rouleau*. En cambio, en estados patológicos la presencia masiva de *rouleaux* puede ser perjudicial para los pacientes que padecen enfermedades vasculares oclusivas, al impedir el flujo sanguíneo en los pequeños vasos y dificultar el proceso de intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los glóbulos rojos. La importancia clínica innegable de estos efectos justifica el hecho de que, a día de hoy, estas formaciones sean el objetivo de numerosas investigaciones, en las que se procura un

conocimiento más profundo tanto de los mecanismos que las originan como de los que las dispersan.

Diversos estudios sobre los mecanismos de formación de los *rouleaux* han demostrado que con el fin de conseguir una formación estable, la energía de agregación proporcionada por los enlaces macromoleculares a la membrana celular debe superar la energía de desagregación debida a la repulsión electrostática entre las superficies de los RBC y los efectos de ruptura mecánica. De hecho, el estado de equilibrio de los eritrocitos en los *rouleaux* corresponde al mínimo de la energía total, incluyendo la energía de adhesión y la energía elástica de la membrana y la energía eléctrica básica debido al potencial transmembrana. Por tanto la formación de *rouleau* puede verse favorecida cuando la energía total de los eritrocitos del sistema disminuye. Esta variación de energía puede darse por causas internas de tipo estructural, metabólico o por cambios temporales, así como por causas externas, como la adición de agentes de agregación –como polímeros dextrosa– o la presencia de campos electromagnéticos.

La atención de este estudio se centra sobre la componente eléctrica de la energía de la célula y su modificación por un campo electromagnético externo. Las células expuestas a campos EM pueden experimentar diversos y profundos cambios bioquímicos y biofísicos. Además de las alteraciones fisiológicas que han sido relatadas incluso a niveles de intensidad relativamente bajos, el campo eléctrico produce cambios en el potencial transmembrana de la célula, y como resultado de la carga superficial inducida sobre la membrana celular, provoca la polarización de la misma. De este modo, las células sometidas a un campo eléctrico se atraen entre sí ya que se favorece la energía de interacción dipolo-dipolo. Este tipo de interacción eléctrica, análoga a la analizada en los fluidos ER, se usa frecuentemente para la alineación de las células biológicas antes del proceso de electrofusión mediante campo de pulsos intensos.

5.4.1. MODELO DE LA RESPUESTA ELÉCTRICA

Con el fin de lograr un mayor entendimiento de la interacción entre el campo EM y las biopartículas se ha analizado la respuesta eléctrica de la célula a través de la carga inducida sobre la superficie de la célula y del potencial transmembrana inducido. Ambos parámetros son importantes no sólo por su relación con el estado fisiológico de la célula, sino también por sus implicaciones en el campo de la electroporación, proceso mediante el cual se introducen moléculas impermeables a la membrana y se controla la salida de sustancias intracelulares mediante una ruptura eléctrica reversible en dicha capa. En base a la carga y al potencial transmembrana inducidos se ha realizado una estimación cuantitativa de la disminución de la energía eléctrica implicada en la formación de un *rouleau* de RBC, cuando se encuentran bajo la acción de un campo electromagnético de frecuencia 1.8 GHz –una de las frecuencias de la onda portadora más usada en telefonía móvil–.

A. Modelo dieléctrico de la célula

Como es sabido, los eritrocitos humanos son células no nucleadas que en equilibrio presentan una forma de disco bicóncavo con un diámetro aproximado de 8 μm . En una aproximación a esta geometría utilizada frecuentemente en la bibliografía, el eritrocito es modelado como una partícula elipsoidal oblata –de semiejes $a = 1.1 \mu\text{m}$ y $b = 3.9 \mu\text{m}$ – rodeada

por una capa que representa la membrana –de espesor $\delta = 8$ nm– conteniendo al medio interno o citoplasma, y separándolo a su vez del medio externo en el que se encuentre suspendido. En nuestro caso, a diferencia de otros estudios en los que se emplea la aproximación confocal, el espesor de la membrana se ha considerado uniforme. En la Figura 5.6(a) y (b) puede observarse la imagen de los glóbulos rojos y de sus características formaciones en pila. En la Figura 5.6(c) se representa esquemáticamente el modelo empleado para la célula bajo estudio. El análisis del problema se realiza a partir de la ecuación de Laplace en aproximación cuasi-estática, dado que las dimensiones de las células son mucho menores que la longitud de onda de la frecuencia empleada.

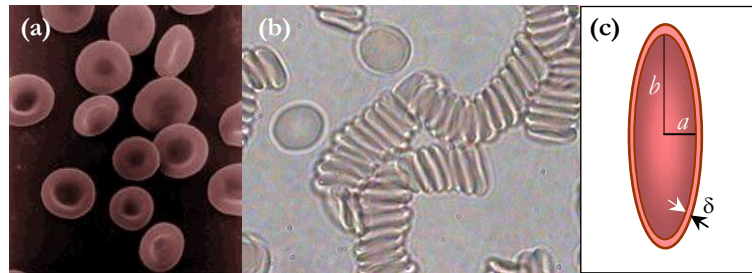


Figura 5.6. Imágenes microscópicas de (a) glóbulos rojos con su característica forma morfológica bicóncava, (b) *rouleaux* de eritrocitos observados en una muestra de sangre (100x). (c) Corte transversal del modelo empleado para el eritrocito: un elipsoide oblato de semiejes $a = 1.1$ μm , $b = 3.9$ μm y una membrana de espesor uniforme $\delta = 8$ nm.

Asimismo, simular la situación real de la célula supone considerar el medio externo y cada uno de los compartimentos celulares como medios conductores, caracterizados por una permitividad compleja $\tilde{\epsilon} = \epsilon - i\sigma/\omega$, donde ϵ es la permitividad, σ la conductividad y ω la frecuencia angular del campo aplicado. En la Tabla 5.1 aparecen listados los parámetros eléctricos de cada uno de los compartimentos.

	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)
Citoplasma	50	0.53
Membrana	9.04	10^{-6}
Medio externo	80	0.12

Tabla 5.1. Valores de los parámetros dieléctricos asociados a cada uno de los medios implicados en el problema.

Como se introdujo en el capítulo 3, frente al planteamiento analítico que limita los modelos celulares a elipsoides confocales y membranas no uniformes, nuestro método numérico presenta la ventaja de poder modelizar el eritrocito como un elipsoide oblato de gran excentricidad con una capa de espesor uniforme. De esta manera se evitan los errores de estimaciones previas en base a modelos analíticos, que subestiman los efectos del campo eléctrico a causa de la no uniformidad de la

membrana, a la que se limitan tales aproximaciones. De hecho, la aproximación analítica del modelo de nuestra célula supondría un espesor en las direcciones y y z de tan sólo 2.25 nm frente a los 8 nm asumidos para el espesor de la membrana celular, espesor que mantendría únicamente en la dirección x de aplicación del campo eléctrico. Consecuentemente, resulta evidente la incorrección que implica para el cálculo de la polarizabilidad la modelización analítica de ésta u otras partículas con capa caracterizadas por una gran excentricidad. Gracias al método numérico establecido ha sido posible no sólo la introducción de capas uniformes en todos los modelos celulares, sino también un análisis del problema más allá de la aproximación dipolar, considerando además los efectos de polarización mutua y las contribuciones multipolares de órdenes mayores. Con todo ello, nos aseguramos una estimación precisa de la polarizabilidad y de las magnitudes de interés implicadas en el problema que, como se presentó en el estudio preliminar de la interacción entre células del apartado 5.2, pueden verse fuertemente influenciadas cuando tratamos distancias cortas en los fenómenos de interacción entre partículas.

B. Interacción mutua de RBC y energía eléctrica del *rouleau*.

Uno de los puntos clave en la interacción de partículas es la distorsión local del campo eléctrico que, originado por la partícula polarizada en sus proximidades, afecta al resto de las células que se encuentran a su alrededor, llegando a modificar su polarización como demostramos en el siguiente análisis. En el dibujo esquemático de la Figura 5.7 se muestra la situación planteada donde se estudia un *rouleau* formado por tres unidades ($n = 3$), estando los eritrocitos separados una distancia d . A la frecuencia de análisis, el momento dipolar inducido en cada célula es negativo, oponiéndose al campo que los induce.

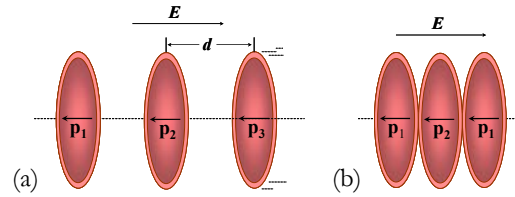


Figura 5.7. Eritrocitos bajo un campo electromagnético de intensidad 1V/m a una frecuencia de 1.8 GHz (a) polarizadas y aisladas bajo el campo E ; (b) polarizadas y formando un *rouleau* bajo el campo E .

El cálculo realizado de la distribución de las densidades de carga a lo largo de las interfases citoplasma-membrana y membrana-medio externo en las unidades celulares del *rouleau* aparece en la Figura 5.8: (i) la célula RBC aislada –considerando que las células están separadas una distancia $d \gg a$ – (ii) la célula RBC central del *rouleau* cuando las células están en contacto a una distancia $d = 2a$, e (iii) la célula externa de la formación. Conviene reseñar que, por la simetría del problema, el resultado para la célula del extremo opuesto de la cadena es análogo. A partir de los resultados mostrados en la figura, en las que se recorre en sentido horario la superficie de la mitad superior de cada célula representada, se pone de manifiesto la influencia de las interacciones mutuas en la distribución de carga, especialmente significativa a lo largo de la dirección del eje menor.

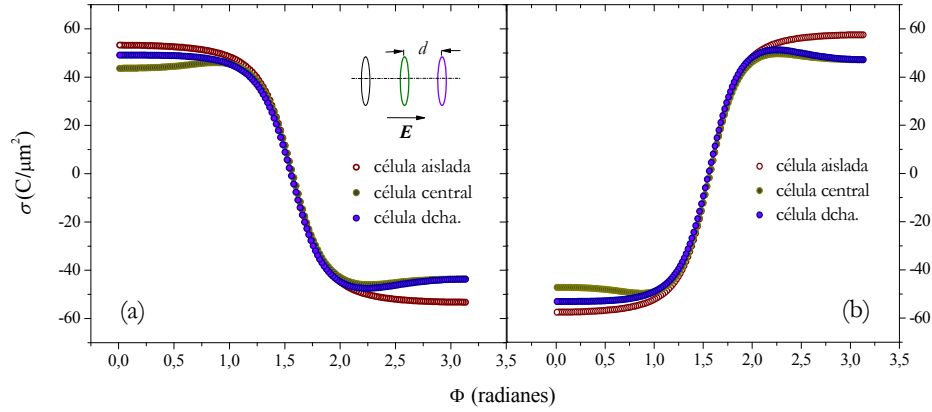


Figura 5.8. Distribución de las densidades de carga inducidas en (a) la interfase citoplasma-membrana, y (b) la interfase membrana-medio externo, según los casos: células aisladas ($d \gg a$) —círculos color burdeos—, o formando un *rouleau* de $n = 3$ RBCs, representando los valores para la célula derecha del triplete —puntos violeta— y la célula central —puntos verde oliva—.

El potencial transmembrana inducido se calcula a partir de la expresión de la densidad de carga compleja en la interfase, introducida ya en el capítulo 3 —ecuación (3.6)— aplicada ahora a la superficie entre los medios citoplasma y membrana, quedando ahora de la forma

$$\tilde{\kappa}_{cm} = \epsilon_0 \frac{\tilde{\epsilon}_c - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_m} \tilde{E}_{cm} \quad (5.8)$$

donde $\tilde{\epsilon}_c$ y $\tilde{\epsilon}_m$ son las permitividades complejas de citoplasma y membrana respectivamente, ϵ_0 la correspondiente al vacío y \tilde{E}_{cm} la componente normal del campo dirigida desde el citoplasma a la membrana. De este modo, la ecuación proporciona la componente normal del campo eléctrico en la interfase como función de la correspondiente densidad de carga $\tilde{\kappa}_{cm}$. La distribución del potencial transmembrana obtenida se representa en la Figura 5.9 para los distintos casos de distanciamiento entre las células del apilamiento. Las curvas siguen el mismo perfil que las distribuciones de carga en la interfase membrana-medio externo de la figura 5.8(b). En comparación con la de la célula aislada, las células en contacto formando el *rouleau* a lo largo de la dirección del campo eléctrico aplicado, sufren una disminución del voltaje a través de la membrana debido a los campos de depolarización. Este efecto está físicamente relacionado con la polarizabilidad negativa de las células en este rango de frecuencias: el campo producido por el dipolo inducido en una de ellas actúa contrarrestando el efecto del campo externo en las células colindantes. Los valores del potencial transmembrana a 1.8 GHz son menores que los encontrados a bajas frecuencias (Liu *et al* 2003) dado que a altas frecuencias el factor dominante es la razón entre las permitividades del medio externo y de la membrana, mientras que en bajas frecuencias el efecto dominante se debe a la relación entre las correspondientes conductividades.

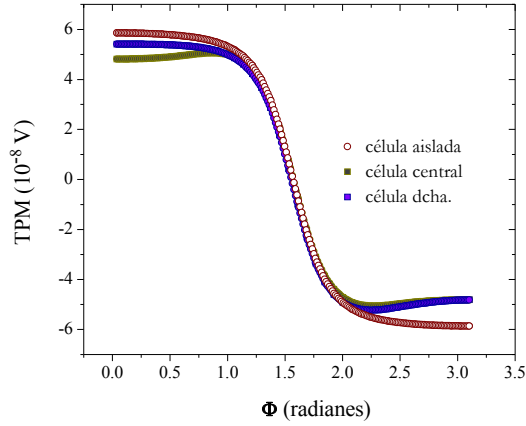


Figura 5.9. Potencial transmembrana inducido a lo largo de la superficie de una célula cuando se encuentra aislada respecto a las otras dos ($d \gg a$) –círculos color burdeos–, o formando un *rouleau* de $n = 3$ RBCs, donde, como en el caso anterior, se representan los valores obtenidos para la célula derecha del triplete –puntos violeta– y la célula central –puntos verde oliva–.

El último punto de este estudio consiste en el análisis de la influencia que un campo electromagnético de radiofrecuencia puede tener sobre la formación de cadenas de glóbulos rojos. Para ello se establece una estimación energética del *rouleau* de RBC considerando, por un lado, la energía de las cargas inducidas en cada interfase de la célula bajo el campo externo y, por otro, la energía de interacción eléctrica entre las cargas. Es decir

$$U = U_0 + \sum U_{ij} \quad (5.9)$$

donde U_0 representa la energía de la célula aislada y polarizada bajo el campo eléctrico, según recoge la ecuación (5.2) y U_{ij} el término relativo a la interacción entre los dipolos inducidos sobre cada célula –formulado en la ecuación (5.3)–. De esta manera, el cálculo efectuado no sólo incluye las interacciones dipolo-dipolo sino que también tiene en cuenta los efectos multipolares de todos los órdenes. Como muestra la Figura 5.10, la diferencia de energía entre un número n determinado de eritrocitos libres, U_0 , y la energía de los mismos agregados, U_n , se hace mayor a medida que los eritrocitos se apilan en la formación del *rouleau*. Esto indica que el estado energético favorable para los eritrocitos, dada la disminución de energía bajo el campo eléctrico, supone la formación de cadenas con un número elevado de unidades.

Por otro lado, la energía estimada a partir de la interacción de las células en aproximación dipolar llega a sobreestimar la disminución de energía en casi un orden de magnitud cuando el *rouleau* está formado por $n \geq 8$ RBCs.

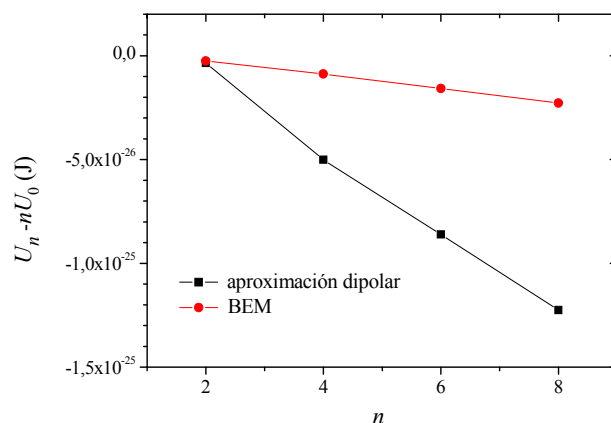


Figura 5.10. Disminución de la energía de un rouleau de n células bajo un campo externo, calculado como la diferencia entre la energía de las células aisladas ($d \rightarrow \infty$) y las de las células del *rouleau* ($d = 2a$). La línea negra inferior representa el cálculo de la energía mediante aproximación dipolar analítica, mientras que la línea roja superior representa el resultado numérico de dicho cálculo energético.

5.5. CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS-T Y FORMACIÓN DE CADENAS

Como puede intuirse a partir de lo expuesto en las secciones previas del capítulo 5, el espectro dielectroforético de una célula se ve afectado por la presencia de células próximas que, interactuando con aquella, originan las características formaciones denominadas *pearl-chains* cuando se tratan suspensiones con altas concentraciones celulares. Es imprescindible conocer en qué medida se ha modificado el espectro a causa de la agregación celular. Para ello, la frecuencia de cruce f_{sc} —parámetro característico del espectro DEP y fácilmente cuantificable que fue introducido en el capítulo 1— es buen indicador de la existencia de dicha fenomenología en una suspensión celular bajo experimentación dielectroforética. Además, la f_{sc} está directamente relacionada con las propiedades dieléctricas de la membrana celular, de modo que diferenciar las causas originarias de los cambios en el espectro DEP es una cuestión relevante, no sólo por el objetivo de lograr un mayor entendimiento de la del fenómeno *pearl-chaining*, sino también por facilitar una correcta caracterización de la célula sin que el proceso resulte enmascarado por los efectos de interacción.

Este es el caso que se da en la experimentación dielectroforética para la caracterización de los linfocitos-T, en la que la frecuencia de cruce se ve desplazada en numerosas ocasiones por la formación de dobletes, tripletes o cadenas de mayor orden, dificultando la precisión en la caracterización de la membrana celular o, por extensión, la manipulación DEP de la células. Precisamente, el presente análisis se inscribe en la colaboración con R. Pethig de la Universidad de Bangor (Gales), dentro de la línea de investigación del sobre la potencialidad de la DEP como método no invasivo para la caracterización de la membrana de los

linfocitos-T. En los linfocitos se desencadena el proceso de activación necesario para que la célula ejerza su función inmunológica, provocando cambios morfológicos y estructurales sobre la membrana que pueden detectarse mediante la DEP. El proceso de activación consiste en la acción conjunta de un estímulo externo –provocado por la presencia del agente antigénico– que es reconocido por unas proteínas específicas situadas en la superficie de la célula, llamadas *receptores T de la célula* (TcR), y de otras moléculas conocidas por *moléculas accesorias*, también presentes en la membrana. Tras los mecanismos de señalización o reconocimiento entre el estímulo externo y la molécula receptora de la superficie, en el núcleo ocurren diversos cambios bioquímicos que activan la célula T, provocando la proliferación de la célula y la segregación de sustancias citotóxicas capaces de lisar las células antigénicas que provocaron su activación. Mientras, el propio linfocito activado presenta una menor complejidad en su membrana, en la que se han observado reducciones importantes en la densidad de microvellosidades o cambios en su arquitectura lipídica. Según recogen estudios de RMN sobre linfocitos, la activación de estas células origina el aumento de la concentración de regiones móviles neutras de lípidos, que se manifiestan como partículas lipídicas submicrométricas embebidas en la membrana plasmática (Veale *et al* 1996). Pero a pesar de la importancia de la función inmunológica de los linfocitos-T, la información disponible acerca de las propiedades dieléctricas de dicho compartimento celular y su relación con la actividad de la célula es todavía escasa.

A través del parámetro frecuencia de cruce f_{xo} , asociado a las propiedades de la membrana, se pretende realizar un seguimiento de los cambios fisiológicos implicados en la activación celular y, consecuentemente, en la funcionalidad del linfocito. Esquemáticamente, en la Figura 5.11 aparece representado el proceso de medida experimental de la frecuencia de cruce: la frecuencia del campo eléctrico aplicado se varía hasta que las células detienen su movimiento y cambian el sentido del mismo. Además de la caracterización del linfocito en base al parámetro DEP f_{xo} , pueden mejorarse los procesos de separación de células por medio de las técnicas *twDEP* – dielectroforesis de onda viajera–, o *FFF-DEP* –fraccionamiento de flujo de campo dielectroforético– introducidos en el primer capítulo. De esta manera, queda abierta la posibilidad de detectar y separar las células activadas y las no activadas en una suspensión sanguínea, con importantes implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de leucemias o enfermedades inmunodeficientes, siempre y cuando la membrana de los linfocitos sufra alteraciones detectables.

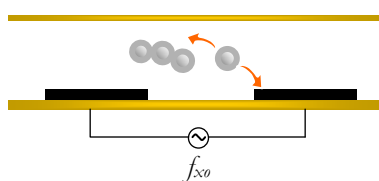


Figura 5.11. Dibujo esquemático de la detección y medida de la frecuencia de cruce f_{xo} , en el que se muestra un corte transversal de la cámara de electrodos del sistema de caracterización. La célula cambia el sentido de su movimiento después de aplicar el voltaje a la frecuencia f_{xo} de modo que si se acercaba al borde de los electrodos pasará a alejarse de ellos, y viceversa.

Nuestra colaboración en dicho estudio, comienza con una primera fase en la que, mediante la observación del parámetro frecuencia de cruce DEP, f_{∞} , se busca la caracterización de la membrana teniendo en cuenta la influencia adicional que sobre dicho parámetro tiene el fenómeno de formación de cadenas. Contrariamente a lo que cabría esperar, a pesar del conocimiento de la interacción dipolar entre partículas polarizadas bajo campos eléctricos y su interpretación en base a la interacción dipolo-dipolo, en el análisis de los experimentos dielectroforéticos este efecto no había sido considerado previamente (Pethig *et al* 1992; Markx *et al* 1994). De hecho, la agregación de células observadas en numerosos experimentos se ha explicado de forma genérica en base a la dielectroforesis positiva o negativa, y a otros factores que influyen sobre este comportamiento, como la geometría de los electrodos y el voltaje aplicado, la frecuencia del campo eléctrico, la conductividad del medio en el que las células se encuentran suspendidas, el tamaño de éstas y el flujo del fluido en la cámara de experimentación. Incluso en campos emergentes de ingeniería microambiental, en los que se busca la formación de estructuras similares a tejidos compuestos por bacterias u otros microorganismos empleando la dielectroforesis, no se ha tenido en cuenta la interacción dipolar mutua entre las biopartículas (Markx *et al* 2004; Venkatesh y Markx 2007). En tales procesos de formación de biopelículas, al no considerar los efectos interpartícula, se comete un error en el estudio de la influencia de factores como el tamaño de la célula o el tipo de célula, directamente relacionados con su polarizabilidad.

De todo ello se deduce la necesidad de un estudio cuantitativo de la influencia de la formación de cadenas en la respuesta dielectroforética del caso que nos ocupa, los linfocitos-T Jurkat. Este análisis proporciona una interpretación de los experimentos dielectroforéticos sin ignorar los efectos de interacción, que no pueden ser despreciados debido a las altas concentraciones de partículas. La validez del método se establece en base al acuerdo encontrado entre el estudio teórico y las observaciones experimentales del comportamiento dielectroforético de los linfocitos-T, bien aisladamente o bien formando cadenas.

5.5.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y RECOGIDA DE DATOS

La parte experimental del trabajo fue realizada en el laboratorio de la Universidad de Bangor. Las células empleadas en este trabajo fueron linfocitos de origen humano, del tipo Jurkat E6-1 procedentes del cultivo American Type Culture Collection (ATCC). Fueron crecidas en una incubadora a 37°C en ambiente húmedo, con un 5% de CO₂, 95% de aire y suspendidas en una solución nutritiva RPMI enriquecida con RPMI 1640 (ATCC) y con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Las células se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento hasta que se dobló su número, y fueron recogidas mediante centrifugación a 500 g durante 5 minutos.

Para la experimentación dielectroforética, las células se lavaron dos veces y fueron resuspendidas en una solución isotónica de sacarosa (8.6%) y dextrosa (0.3%), con 1 mg/ml de suero de albúmina bovina BSA (SIGMA), con un pH de 7.4. La conductividad fue medida con un conductímetro YSI 3200, ajustando la solución a una conductividad de 40 ± 0.5 mS/m a 25 °C mediante la adición de medio mínimo esencial MEM modificado de Eagle (ATCC). La osmolaridad medida con un osmómetro de presión de vapor, VAPRO 5520, era de 296 ± 3 mmol/kg.

El fenómeno DEP experimental se realiza en cámaras de medida integradas con un sistema óptico de descripción celular (Lee *et al* 2006). Por medio de una pipeta se depositan las suspensiones celulares de unas 10^6 células/ml en las celdas de microelectrodos fabricados mediante las técnicas estándar de fotolitografía, descritas en el cuarto capítulo o en la literatura (Pethig *et al* 2002; Pethig *et al* 2004). Sobre los electrodos se aplica un voltaje AC a frecuencias seleccionadas, provocando dielectroforesis positiva y negativa de forma alterna. El movimiento DEP inducido sobre las células se controla mediante cámaras que capturan 30 imágenes por segundo. La posición de cada célula es seguida y normalizada respecto a la intensidad de la variación del campo eléctrico y el gradiente de campo entre los bordes de los electrodos. Las velocidades de las células fueron calculadas con una precisión de $\pm 0.1 \mu\text{m/s}$. El diámetro de cada célula se obtiene a partir del valor promedio recogido en las imágenes de cada experimento, con una precisión estimada de $\pm 0.25 \mu\text{m}$. Se extraen las frecuencias de cruce f_{co} de las células aisladas o en formación catenaria, a las que ocurre la transición entre la dielectroforesis positiva y la negativa, por interpolación de las respuestas DEP a ambos lados de la frecuencia de cruce.

5.5.2. MODELO DIELECTRICO DE LA CÉLULA

La estimación teórica de la frecuencia de cruce del linfocito-T se ha realizado mediante el modelo de una partícula esférica de una sola capa, sin incluir la membrana que rodea al núcleo en el citoplasma de la célula, ya que a las frecuencias empleadas su respuesta depende únicamente de las características de la membrana citoplasmática. Los valores asignados para la descripción de la célula están basados en valores recogidos en bibliografía (Schwan *et al* 1970). Como la mayor parte de las células de mamíferos, los linfocitos poseen una membrana prácticamente aislante que rodea al medio citoplasmático conductor. Sus parámetros dieléctricos se encuentran en un rango de valores comprendidos entre 6 y 15 mF/m², para la capacidad C_m , y entre 10 y 1000 S/m² para la conductancia G_m . Para la estimación inicial que se realiza de la frecuencia de cruce se ha tomado $C_m = 6 \text{ mF/m}^2$, valor típico aceptado para la capacidad de la membrana biológica, fijando la conductancia al valor $G_m = 100 \text{ S/m}^2$. El espesor de la membrana se establece como $\delta = 4.5 \text{ nm}$, resultando unos valores para la permitividad y la conductividad de la membrana de $\epsilon_m = 3.05\epsilon_0$ y $\sigma_m = 4.5\text{e-}4 \text{ mS/m}$. Los parámetros asociados para el citoplasma son permitividad $\epsilon_c = 50\epsilon_0$ y conductividad $\sigma_c = 1 \text{ S/m}$, mientras que la permitividad y conductividad del medio externo son los valores experimentales $\epsilon_{\text{ext}} = 79\epsilon_0$, $\sigma_{\text{ext}} = 40 \text{ mS/m}$.

5.5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores experimentales de las frecuencias de cruce f_{co} y los radios celulares correspondientes, obtenidos por el sistema de caracterización celular del laboratorio de la Universidad de Bangor para unas 800 células-T, se muestran en la Figura 5.12. En ella los puntos negros representan las frecuencias f_{co} extraídas para las células que se encontraban aisladas, y los círculos rojos las correspondientes a aquellas que formaban cadenas celulares. La línea negra es la estimación teórica de las frecuencias de cruce calculadas para los distintos valores medidos del radio celular. Esta estimación parece marcar la tendencia media de la nube de puntos, aún cuando estos muestran una gran dispersión.

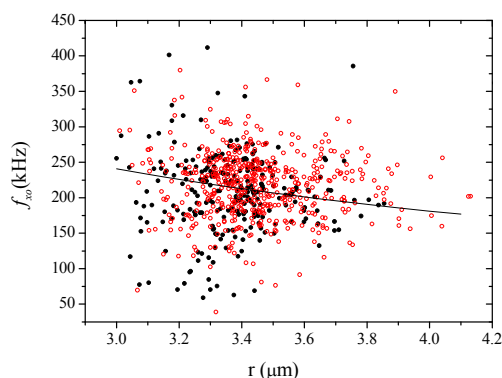


Figura 5.12. Frecuencias de cruce DEP experimentales para células Jurkat individuales (puntos negros) y células encadenadas (círculos rojos). La línea sólida representa la frecuencia de cruce modelada teóricamente en función de los radios observados para una célula típica individual.

Con el fin de comprender el fenómeno observado, y dada la interacción entre algunas células bajo el campo eléctrico formando dobletes, tripletes o cadenas de mayor orden, se analizan y comparan separadamente las frecuencias de cruce relativas a una célula aislada de aquellas medidas para las células agregadas. En la Figura 5.13(a) se recoge la distribución acumulativa de las células observada en función de su frecuencia de cruce en cada uno de los dos casos antes mencionados. A través de las curvas de la figura se detecta el desplazamiento de la frecuencia de cruce f_{xo} hacia altas frecuencias en el caso de cadenas celulares respecto al caso de la célula aislada.

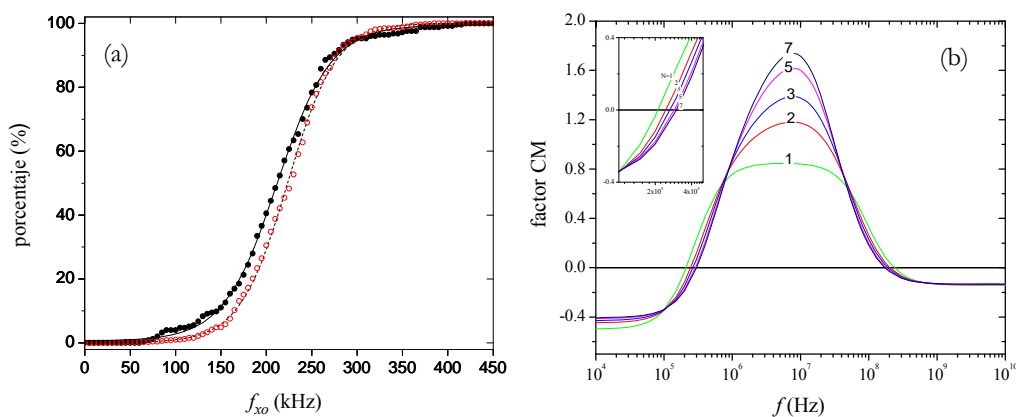


Figura 5.13. (a) Distribución acumulativa de las frecuencias de cruce experimentales f_{xo} para células individuales –puntos negros– y cadenas celulares –círculos rojos–; (b) estimación teórica del desplazamiento de la frecuencia f_{xo} a través del factor de Clausius-Mossotti efectivo por unidad celular, como función de la frecuencia para cadenas de N células. El recuadro insertado muestra el desplazamiento del espectro en la región de cruce.

Este efecto, que puede ser entendido como consecuencia de la polarización mutua entre las células más próximas, presenta un desplazamiento promedio de 10.7 kHz. Por su parte, la predicción teórica del desplazamiento de f_{∞} cuando las células se unen en formaciones lineales aparece en la Figura 5.13(b), donde se muestra el espectro DEP en función del factor de Clausius-Mossotti para cadenas de N células con radio igual al radio medio experimental. El desplazamiento teórico de f_{∞} derivado de este estudio muestra un cambio hacia altas frecuencias acorde con la observación experimental, aunque la magnitud de dicho cambio, siendo del mismo orden, es menor. Por otro lado, puede observarse en la figura que los picos de la respuesta dielectroforética aumentan con el número de células interactuantes, posiblemente debido a las imágenes eléctricas inducidas por las células próximas. De hecho, el valor efectivo del factor de Clausius-Mossotti por célula puede ser mayor que la unidad a causa de la interacción mutua.

Como se comentó al principio del capítulo, la dependencia de la frecuencia de cruce f_{∞} de los parámetros de la membrana puede ser la clave que explique la diferencia encontrada entre ambas estimaciones. La relación existente entre f_{∞} y los parámetros dieléctricos de la membrana se ha establecido en base a la condición, implícita en la definición de la f_{∞} , de que a dicha frecuencia las propiedades dieléctricas de la células se igualan a las del medio, resultando así la célula inalterable bajo el campo eléctrico. Jones presenta esta relación a través de la expresión (Jones 1995)

$$f_{\infty} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{(\sigma_{ext} - \sigma_p)(\sigma_p + 2\sigma_{ext})}{(\epsilon_p - \epsilon_{ext})(\epsilon_p + 2\epsilon_{ext})}} \quad (5.10)$$

donde los subíndices ‘ext’ y ‘p’ se refieren al medio externo y a la partícula o célula, respectivamente. A través de las relaciones y aproximaciones relativas a las propiedades eléctricas de las células —a frecuencias por debajo de la dispersión de Maxwell-Wagner las propiedades dieléctricas de la célula están relacionadas con las de la membrana según las expresiones $\epsilon_p \approx r\epsilon_m/\delta$ y $\sigma_p \approx r\sigma_m/\delta$ (Huang *et al* 1996)—, la ecuación (5.10) se simplifica, resultando

$$f_{\infty} = \frac{\sqrt{2}}{8\pi r C_m} \sqrt{(4\sigma_{ext} - rG_m)^2 - 9r^2 G_m^2} \quad (5.11)$$

donde r es el radio de la célula y C_m , G_m son la capacidad y conductancia por unidad de área de la membrana, respectivamente. Teniendo en cuenta que $r \gg \delta$ y que en las condiciones experimentales de trabajo con células viables, $\sigma_{ext} \gg \sigma_m$, la ecuación (5.11) finalmente resulta

$$f_{\infty} = \frac{\sqrt{2}}{2\pi r C_m} \sigma_{ext} \quad (5.12)$$

El valor típico aceptado para la capacidad de la membrana biológica es de unos 6 mF/m² (Pethig y Kell 1987), límite inferior antes mencionado. Sin embargo, es conocida la presencia de pliegues e invaginaciones en la superficie de la membrana celular —como se muestra en la Figura 5.14— lo que puede contribuir al aumento de su valor (Wang *et al* 1994; Pethig *et al* 2002; Yang *et al* 1999). Posiblemente esta heterogeneidad morfológica de las células sea una

de las causas de las dispersiones de la frecuencia f_{co} observada para las distintas células en la figura 5.12.

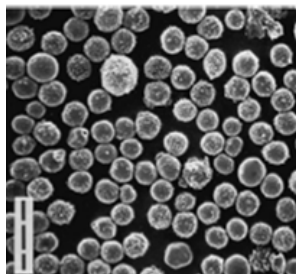


Figura 5.14. Imagen de los linfocitos-T obtenida por microscopía electrónica de barrido. La longitud de la barra es de 20 μm (Yang *et al* 1999).

Un primer análisis de la influencia de la irregularidad superficial de la célula sobre la frecuencia f_{co} se ha realizado introduciendo el parámetro topográfico Φ que describe la rugosidad de la membrana. El factor Φ representa la razón entre la capacidad de la capa celular bajo estudio y la correspondiente a una membrana perfectamente lisa que rodeara el citoplasma. Así, mediante este parámetro físico considerado en diversos trabajos (Wang *et al* 1994; Pethig *et al* 2002; Pethig y Talary 2007), no sólo se considera el efecto de una mayor superficie celular debido a los pliegues o invaginaciones de la capa, sino también otros posibles factores geométricos o moleculares que aumentaran la capacidad efectiva de la membrana.

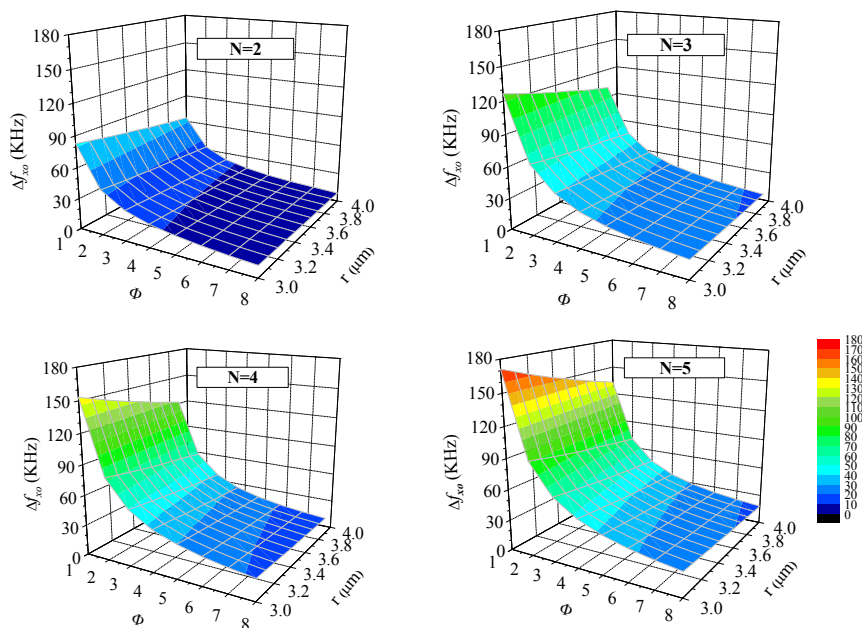


Figura 5.15. Dependencia teórica de la frecuencia de cruce f_{co} como función del radio celular y el factor topográfico Φ para cadenas de células de 2 a 5 unidades.

En la Figura 5.15 se muestra el análisis teórico de la dependencia de f_{xo} con el radio celular y el factor topográfico Φ realizado para agregados celulares de 2 a 5 unidades. A través de las superficies Δf_{xo} representadas se refleja, conforme al resultado mostrado en la figura 5.13(b), el incremento del desplazamiento de la frecuencia de cruce Δf_{xo} con el del número de células agregadas, habiendo calculado Δf_{xo} respecto a la frecuencia de cruce de una única partícula con superficie lisa $\Phi = 1$. Como puede deducirse de las gráficas de la figura 5.15, el incremento de Δf_{xo} es más pronunciado cuanto menos rugosas son las superficies celulares.

Una vez introducido el parámetro topográfico que define la irregularidad de la superficie, y con el objetivo de caracterizar la membrana, se ha realizado una estimación de su valor a través de los datos experimentales recogidos. Considerando separadamente las partículas individuales y las que forman cadenas, para cada uno de los casos se ha promediado el radio celular observado y la frecuencia de cruce recogida. En la Figura 5.16 se muestran las frecuencias de cruce calculadas considerando los radios medios, los distintos valores del factor topográfico y el número de células agregadas. La comparación entre los resultados experimentales –círculo sólidos– y teóricos –símbolos huecos– indica que el factor topográfico se halla entre $\Phi = 2$ y $\Phi = 3$, rango en el que se encuentra el valor de $\Phi = 2.2$ estimado para las células-T Jurkat en un trabajo previo (Pethig *et al* 2002). Sin embargo, aunque según puede deducirse de la figura, Φ toma valores próximos a 2.2 en los casos de partícula aislada y dobletes celulares, para $n > 3$ células el ritmo de aumento de f_{xo} experimental con el número de células que forman la cadena es pequeño en comparación con la pendiente de las curvas teóricas.

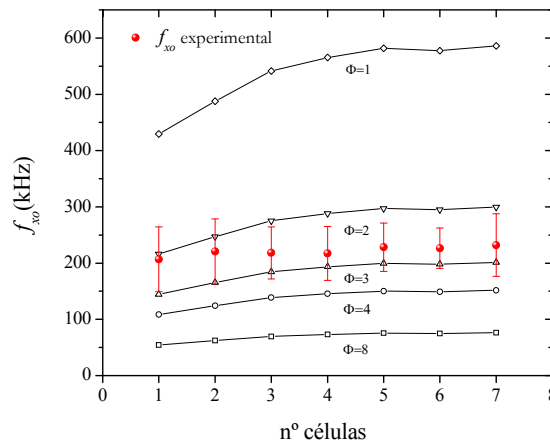


Figura 5.16. Frecuencia de cruce f_{xo} calculada para cadenas de N linfocitos y diferentes factores topográficos Φ . Los puntos rojos representan los valores experimentales promediados de la frecuencia de cruce f_{xo} , mostrados junto con las barras de error de su desviación estándar.

Esta diferencia entre el comportamiento observado y el esperado probablemente refleja el hecho de que las rugosidades que puedan encontrarse en la membrana celular no sólo provocan un aumento de la capacidad efectiva de la capa y, consecuentemente, una disminución de la frecuencia f_{xo} sino que además, interfieren en la interacción entre células próximas al hacer que la distancia entre las

células en contacto sea mayor que $2r$, el valor correspondiente entre los centros de los modelos esféricos empleados para la estimación teórica.

5.6. CONCLUSIONES

El análisis de las situaciones de proximidad entre células de distintos tamaños y geometrías ha supuesto el primer punto de estudio de este capítulo, en la aplicación del método numérico desarrollado como alternativa y mejora de las aproximaciones analíticas al problema. Como se recoge de lo presentado en el apartado 2, nuestro método numérico permite superar las limitaciones de la teoría de dipolo puntual o de las expansiones multipolares truncadas en el tratamiento de la interacción de partículas próximas, ya que incluye las contribuciones multipolares de mayor orden y los efectos de distorsión local del campo por cada una de las partículas polarizadas. Esto ha permitido analizar con mayor fiabilidad la influencia que la forma y la polidispersión ejercen sobre las biopartículas interaccionando bajo el campo eléctrico, resultando significativas las diferencias obtenidas para la fuerza de interacción según los distintos tamaños y formas –figuras 5.3 y 5.4–. Una adecuada parametrización de las curvas obtenidas permite una precisa descripción de la fuerza entre partículas con diversas formas y geometrías, lo que supone una mejora sustancial respecto a la aproximación dipolar típicamente usada en las simulaciones de fluidos electrorreológicos (ER) o de dinámica molecular (MD).

Visto el importante papel que juega la forma del modelo aplicado para la célula con el objetivo de una correcta computación de las fuerzas de interacción mutua o de otras magnitudes relacionadas, en el siguiente punto tratado se ha evaluado el efecto del campo eléctrico de radiofrecuencia sobre el fenómeno de agregación o formación de *rouleaux* observado en glóbulos rojos. Cada una de las células se representa por un elipsoide oblató rodeado por una membrana que, a diferencia del modelo analítico, es de espesor uniforme. El enfoque del problema ha permitido el estudio de la influencia mutua entre células próximas a través de importantes magnitudes eléctricas, como la densidad de carga inducida en las interfases citoplasma-membrana y membrana-medio externo, el correspondiente momento dipolar neto y el potencial transmembrana inducido sobre un determinado eritrocito durante la formación del *rouleau*.

La comparación de energías de eritrocitos libres y agregados revela que la formación de *rouleaux* es energéticamente favorable cuando las células están inmersas en el campo electromagnético. Las diferencias de energía calculadas cuando el campo externo es de 1 V/m de intensidad –orden de magnitud del campo en los fluidos corporales bajo una exposición estándar a la frecuencia de trabajo– son mucho más pequeñas que las energías de adhesión o mecánicas implicadas en el proceso normal de agregación de eritrocitos, llegando a representar la milésima o centésima parte de la energía de adhesión. Eso sí, la dependencia de la energía eléctrica aumenta con el cuadrado de la intensidad del campo, lo que implica que la influencia de la exposición a altos niveles de campos eléctricos no puede ser desestimada. Por otro lado, la existencia de inhomogeneidades en la membrana –no consideradas en el modelo aquí empleado–, podría producir regiones locales de alta intensidad de campo, y así modificar

las propiedades de agregación. A través del modelo empleado obtenemos una mayor comprensión de las interacciones celulares que originan los *rouleaux* o las formaciones denominadas *pearl-chains* bajo campos eléctricos, constituyéndose en una herramienta potencial en los campos relacionados con la dielectroforesis para la manipulación y alineación de células, que se da, por ejemplo, como preámbulo al proceso de la electrofusión.

Finalmente, a través del método numérico se ha realizado un estudio de los efectos dipolares de formación de cadenas entre células bajo experimentación dielectroforética. A partir de la polarizabilidad de las células, se ha determinado cómo la formación de cadenas influye sobre la frecuencia a la que ocurre la transición entre la DEP positiva y la DEP negativa. Hasta donde sabemos este es el primer estudio del efecto, a pesar de que es un fenómeno ampliamente conocido. Los cálculos teóricos muestran un buen acuerdo cualitativo y parcialmente cuantitativo con los resultados experimentales obtenidos, por lo que la información aquí aportada puede resultar especialmente útil para los protocolos en procesos de separación de células basados en DEP, sobre todo en casos de altas concentraciones celulares donde el número de cadenas inducidas puede superar a las células que permanecen sin agregarse.

El siguiente paso a este estudio sería complementarlo con la caracterización de las células-T activadas para el desarrollo de su función inmunológica. Sabiendo que la membrana de estas células presenta diferencias estructurales y morfológicas respecto a las no activadas, el estudio de uno y otro estado de la célula mediante la frecuencia f_{xo} dielectroforética –pudiendo tener en cuenta mediante el análisis teórico los efectos de desplazamiento de f_{xo} como consecuencia de la formación de cadenas– puede proporcionar información relevante respecto a los cambios fisiológicos que acompañan a los eventos de señalización y ayudar a la diferenciación y separación de distintas subpoblaciones celulares en base a su funciones biológicas.

Si bien se ha presentado en el trabajo una primera aproximación a la inhomogeneidad superficial de la célula por medio de un factor topográfico del que nos hemos servido para analizar el comportamiento de los linfocitos-T, ha quedado patente la necesidad de mejorar el modelo de la célula mediante la introducción de una geometría irregular que simule su superficie. De esta manera, la caracterización de la membrana de los linfocitos –y su posterior diferenciación entre el estado activado e inactivado y de la célula– a través de la frecuencia de cruce quedaría reforzada por el estudio teórico del comportamiento DEP de una partícula de superficie rugosa. Una ampliación del estudio en este sentido se presenta en el capítulo siguiente de la tesis.

5.7. BIBLIOGRAFÍA

- Clercx HJH y Bossis G (1993). *Many-Body Electrostatic Interactions in Electrorheological Fluids*. Physical Review E 48(4): 2721.
- Crane JS y Pohl HA (1972). *Theoretical Models of Cellular Dielectrophoresis*. Journal of Theoretical Biology 37(1): 15.
- Davis LC (1992). *Finite-Element Analysis of Particle-Particle Forces in Electrorheological Fluids*. Applied Physics Letters 60(3): 319-321.
- Huang Y, Wang XB, Becker FF y Gascoyne PRC (1996). *Membrane Changes Associated with the Temperature-Sensitive P85(Gag-Mos)-Dependent Transformation of Rat Kidney Cells as Determined by Dielectrophoresis and Electrorotation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1282(1): 76-84.
- Jones TB (1995). *Electromechanics of Particles*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Klingenberg DJ, van Swol F y Zukoski CF (1991a). *The Small Shear Rate Response of Electrorheological Suspensions. I. Simulation in the Point--Dipole Limit*. The Journal of Chemical Physics 94(9): 6160-6169.
- Klingenberg DJ, van Swol F y Zukoski CF (1991b). *The Small Shear Rate Response of Electrorheological Suspensions. Ii. Extension Beyond the Point--Dipole Limit*. The Journal of Chemical Physics 94(9): 6170-6178.
- Lee RS, Pethig R y Talary MS (2006). *Dielectrophoretic Particle Profiling System and Method*. United States, Aura BioSystems Inc. Patent 7063777.
- Liu C, Sheen D y Huang K (2003). *A Hybrid Numerical Method to Compute Erythrocyte Temp in Low-Frequency Electric Fields*. IEEE Transactions on Nanobioscience 2(2): 104-109.
- Llamas M, Giner V y Sancho M (1998). *The Dynamic Evolution of Cell Chaining in a Biological Suspension Induced by an Electrical Field*. Journal of Physics D: Applied Physics 21: 3160-3167.
- Markx GH, Andrews JS y Mason VP (2004). *Towards Microbial Tissue Engineering?* Trends in Biotechnology 22(8): 417-422.
- Markx GH, Huang Y, Zhou XF y Pethig R (1994). *Dielectrophoretic Characterization and Separation of Microorganisms*. Microbiology-UK 140: 585-91.
- Pethig R, Bressler V, Carswell-Crumpton C, Chen Y, Foster-Haje L, Garcia-Ojeda ME, Lee RS, Lock GM, Talary MS y Tate KM (2002). *Dielectrophoretic Studies of the Activation of Human T Lymphocytes Using a Newly Developed Cell Profiling System*. Electrophoresis 23(13): 2057-2063.
- Pethig R y Kell DB (1987). *The Passive Electrical-Properties of Biological-Systems - Their Significance in Physiology, Biophysics and Biotechnology*. Physics in Medicine and Biology 32(8): 933-970.

- Pethig R, Lee RS y Talary MS (2004). *Cell Physiometry Tools Based on Dielectrophoresis*. Journal of the Association for Laboratory Automation 9(5): 324-330.
- Pethig R y Talary MS (2007). *Dielectrophoretic Detection of Membrane Morphology Changes in Jurkat T-Cells Undergoing Etoposide-Induced Apoptosis*. IET Nanobiotechnology 1(1): 2-9.
- Pethig R, Ying H, Xiao-bo W y Burt JPH (1992). *Positive and Negative Dielectrophoretic Collection of Colloidal Particles Using Interdigitated Castellated Microelectrodes*. Journal of Physics D-Applied Physics 24(5): 881-8.
- Sancho M, Giner V y Martínez G (1997). *Monte Carlo Simulation of Dielectrophoretic Particle Chain Formation*. Physical Review E 55(1): 544.
- Schwan HP, Takashima S, Miyamoto VK y Stoeckenius W (1970). *Electrical Properties of Phospholipid Vesicles*. Biophysical Journal 10(11): 1102-1119.
- Siu YL, Wan JTK y Yu KW (2001). *Interparticle Force in Polydisperse Electrorheological Fluids: Beyond the Dipole Approximation*. Computer Physics Communications 142(1-3): 446-452.
- Tan Z-J, Zou X-W, Zhang W-B y Jin Z-Z (1999). *Influences of the Size and Dielectric Properties of Particles on Electrorheological Response*. Physical Review E 59(3): 3177.
- Veale MF, Dingley AJ, King GF y King NJC (1996). *¹H-Nmr Visible Neutral Lipids in Activated T Lymphocytes: Relationship to Phosphatidylcholine Cycling*. Biochimica Biophysica Acta 1303: 215-221.
- Venkatesh AG y Markx GH (2007). *On the Height of Cell Aggregates Formed with Positive Dielectrophoresis*. Journal of Physics D-Applied Physics 40.
- Wang XB, Huang Y, Gascoyne PRC, Becker FF, Holzel R y Pethig R (1994). *Changes in Friend Murine Erythroleukemia Cell-Membranes During Induced-Differentiation Determined by Electrorotation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1193(2): 330-344.
- Yang J, Huang Y, Wang XJ, Wang XB, Becker FF y Gascoyne PRC (1999). *Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion*. Biophysical Journal 76(6): 3307-3314.
- Yu KW y Wan JTK (2000). *Interparticle Force in Polydisperse Electrorheological Fluids*. Computer Physics Communications 129(1-3): 177-184.

Capítulo 6

SUPERFICIES CELULARES RUGOSAS Y CAMPOS EM

En numerosas ocasiones las células biológicas presentan estructuras complejas a nivel superficial debido a la presencia de microvellosidades, invaginaciones, bolsas, etc. La rugosidad resultante en la superficie celular puede ser provocada al someter a la célula a estrés osmótico o determinados tratamientos químicos, siendo también en ocasiones una característica propia de determinados tipos celulares. Hasta el momento, los modelos celulares empleados para el estudio numérico de la interacción entre el campo electromagnético y las biopartículas, no incluían referencia alguna a la rugosidad superficial. De este modo, la descripción de los efectos del campo en estos casos quedaba incompleta. En un primer acercamiento al problema, se han analizado las respuestas dieléctricas de modelos bidimensionales de las partículas con superficies rugosas mediante el método de los elementos de contorno, considerado diferentes morfologías por medio de una aproximación sinusoidal a la superficie y otra fractal. Asimismo, empleando el método de diferencias finitas, hemos analizado el modelo tridimensional para una célula rugosa. Finalmente, se ha aplicado un modelo fractal para completar el estudio de la caracterización de la membrana, presentado en el capítulo anterior, en el caso de la interacción entre los linfocitos o células-T.

6.1. INTRODUCCIÓN

Cuando se analizan imágenes de microscopía electrónica de distintas clases celulares es fácil observar en algunas de ellas la rugosidad de su capa más externa, así como de las envolturas membranosas de determinados orgánulos celulares. Además, debido a la capacidad de los organismos vivos para adaptarse al medio en el que se encuentran, éstos regulan el volumen y configuración de sus componentes. Así, distintas células sanguíneas, como los eritrocitos o los linfocitos, cambian sus formas dependiendo de la tonicidad del medio, presentando extensiones y pliegues en su membrana cuando se encuentran en soluciones hipertónicas o isotónicas, mientras que en medios hipotónicos suelen aumentar sus dimensiones y alisar sus superficies. Igualmente, se sabe que la morfología superficial de la célula puede revelar su viabilidad o no viabilidad, o su estado patológico, como ocurre en el caso de células leucémicas o cancerosas. Por otra parte, la sobreestimación obtenida de los parámetros eléctricos de la membrana como consecuencia de sus irregularidades morfológicas, no consideradas en los modelos dieléctricos previos, es indicio claro de la necesidad de incluir tal característica en el modelo. De este modo, a través de modelos que no consideran la irregularidad de la superficie, los parámetros obtenidos para la membrana deben considerarse como valores efectivos que caracterizan en promedio sus propiedades dieléctricas.

A pesar de la importancia que tiene la inclusión de la estructura superficial en los modelos que describen la respuesta eléctrica de las suspensiones celulares, los métodos computacionales no siempre son capaces de integrarla en su modelo. El tratamiento de las superficies rugosas se ha resuelto a frecuencias ópticas en base a los fenómenos de dispersión mediante la teoría de Kirchhoff, usando la aproximación de plano tangente de modo que permite la aplicación local de las leyes de Fresnel (Caron *et al* 2002). En cambio, para las frecuencias típicas de experimentación espectroscópica o electrocinética, donde el tamaño de los pliegues de la rugosidad es comparable o mayor que la longitud de onda del campo, la incorporación detallada de la morfología de las superficies dieléctricas supone un reto para las posibilidades de los métodos computacionales existentes. De hecho, ésta es posiblemente la principal razón por la que, a pesar de su obvio interés, no existen estudios en los que se hayan considerado las superficies rugosas en los modelos de las partículas dieléctricas.

En este trabajo, a través de dos aproximaciones a la morfología superficial de la célula, por medio de dos planteamientos matemáticos distintos –ondulaciones sinusoidales y geometría fractal– se ha incorporado la rugosidad a los modelos para realizar el análisis de su respuesta dieléctrica. La geometría fractal, introducida por Mandelbrot ya en la década de los ochenta (Mandelbrot 1982), se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de numerosas estructuras dentro de los campos de la biología y la medicina (Bordi *et al* 1990; Bordi *et al* 1993; Cross 1997; Heymans *et al* 2000; Bordi *et al* 2002), debido a sus propiedades de autosimilitud e invarianza bajo contracción y expansión de múltiples estructuras complejas. La necesidad de cuantificar la irregularidad de las superficies de forma simple, hace también que la geometría fractal sea muy adecuada para el análisis de las rugosidades superficiales: a través de un único parámetro, la dimensión fractal D , que es una cantidad no entera, puede

obtenerse una descripción global de la heterogeneidad del sistema analizado, que es, además, invariante frente a los cambios dimensionales. En el ámbito citológico, la alta irregularidad de la membrana celular, debida a la presencia de microvellosidades y protusiones, queda descrita mediante este tipo de geometría. De hecho, la geometría fractal ha abierto una vía más para la caracterización del estado funcional o patológico de las células, realizada en ocasiones a través del estudio de su rugosidad por medio de imágenes de microscopía electrónica. Así se han analizado las diferencias entre células sanas y cancerosas, determinando un rango de valores para la dimensión fractal en función de su estado. Losa y su grupo extrajeron las dimensiones fractales de linfocitos humanos en diversos estados, mediante un método probabilístico aplicado a las imágenes microscópicas recogidas de los contornos celulares (Losa *et al* 1992). Determinaron una mayor dimensión fractal para los linfocitos sanos, de acuerdo con el conocido hecho de que estas células sanas o en estado viable presentan una mayor rugosidad que las células cancerosas o no viables. Anteriormente Bordi (1990) ya había introducido la geometría fractal para el análisis de las medidas de impedancia de suspensiones de eritrocitos y linfocitos humanos, ampliando después el estudio de la rugosidad de los linfocitos en condiciones fisiológicas normales o sometidos a medios hipo e hipertónicos, de modo que sus membranas presentaran distintos grados de complejidad superficial (Bordi *et al* 1993).

En este primer acercamiento al problema se han planteado algunos modelos para geometrías en 2D, y los resultados se han interpretado usando métodos complementarios: el método BEM estándar para el cálculo del potencial electrostático, y el método BEM para las cargas inducidas en las interfases, ambos en aproximación cuasiestática. Además se ha empleado un modelo en 3D que, con el método de elementos finitos, ha permitido completar este estudio preliminar de la influencia de la rugosidad en la caracterización celular.

Sabiendo que la mayoría de las superficies presentan cierto grado de rugosidad, la inclusión de estructuras superficiales en los modelos que describen el comportamiento eléctrico puede ayudar no sólo en la caracterización de las partículas en medidas de espectroscopía dieléctrica y electrocinéticas, sino también en el diseño y desarrollo tecnológico de nuevas aplicaciones en este campo o en campos relacionados, en el estudio de la ruptura dieléctrica de materiales aislantes, en el desarrollo de condensadores con capacidades muy elevadas por medio de superficies fractales, o en el estudio de las respuestas electrorreológicas de suspensiones de partículas.

6.2. METODOLOGÍA

La respuesta de la partícula dieléctrica al campo externo se evalúa a través la magnitud compleja de la polarizabilidad $\tilde{\alpha}$. Esta propiedad está relacionada con el momento dipolar inducido sobre la partícula por medio de la expresión:

$$\tilde{\mathbf{p}} = \tilde{\alpha}(\omega) \tilde{\mathbf{E}} \quad (6.1)$$

donde $\bar{\mathbf{p}}$ es el momento dipolar efectivo de la partícula, $\tilde{\mathbf{E}} = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$ es el campo eléctrico externo aplicado, y ω la frecuencia angular del campo. Para llevar a cabo la evaluación de la polarizabilidad se han empleado los siguientes métodos.

6.2.1. MÉTODO BEM PARA EL POTENCIAL CUASI-ESTÁTICO

Este método está basado en la siguiente ecuación integral

$$\frac{\varepsilon_i + \varepsilon_j}{2} \phi(\mathbf{r}) = \phi_0(\mathbf{r}) + (\varepsilon_i - \varepsilon_j) \int_L \phi(\mathbf{r}') \frac{\partial G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')}{\partial n'} dl' \quad (6.2)$$

donde ϕ es el potencial eléctrico en un punto de la interfase dieléctrica entre los medios de permitividad compleja, inmerso en un potencial externo ϕ_0 , extendiéndose la integral al contorno de la interfase. $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ es la función de Green definida por $\nabla^2 G = \delta(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$. Para problemas en 2D, $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \ln|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|/2\pi$. La singularidad del punto $\mathbf{r} = \mathbf{r}'$ ha sido integrada y la integral en el segundo miembro de (6.2) se interpreta como el valor principal de Cauchy. Esta formulación puede extenderse fácilmente a los casos de varias superficies dieléctricas.

La discretización del problema se ha resuelto dividiendo el contorno en N sub-elementos de longitud Δ , transformando de esta manera la ecuación (6.2) en un sistema algebraico de ecuaciones. Los coeficientes A_{ij} se obtienen analíticamente mediante la expresión

$$A_{ij} = \int_{\Delta} \frac{d}{dn} [\ln|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|] = \int_{\Delta} \frac{\cos \theta}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} dl' = \varphi \quad (6.3)$$

donde φ es el ángulo subtendido por el elemento j desde el centro del elemento i . El sistema de ecuaciones para el cálculo del potencial en los N puntos sobre el contorno se resuelve por un método de triangulación.

6.2.2. MÉTODO BEM PARA LA DENSIDAD DE CARGA EN LAS INTERFACES

Para determinado tipo de aplicaciones, especialmente las relacionadas con efectos ponderomotrices provocados por campos electromagnéticos, se han demostrado en anteriores capítulos las ventajas que presenta la formulación del método de elementos de contorno basado en la densidad de carga inducida en las interfaces. La ecuación integral correspondiente para este caso es

$$\frac{\varepsilon_i + \varepsilon_j}{2} \tilde{\kappa}(\mathbf{r}) = (\varepsilon_i - \varepsilon_j) \tilde{\kappa}_0(\mathbf{r}) + (\varepsilon_i - \varepsilon_j) \int_L \tilde{\kappa}(\mathbf{r}') \frac{\partial G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')}{\partial n'} dl' \quad (6.4)$$

donde $\tilde{\kappa}(\mathbf{r})$ es la densidad de carga compleja en un punto \mathbf{r} de la interfase dieléctrica y $\tilde{\kappa}_0(\mathbf{r}) = \varepsilon_0 E_{ij}^0(\mathbf{r})$, con E_{ij}^0 la componente normal del campo eléctrico, apuntando desde el medio i al medio j . El carácter complejo de la permitividad de cada medio, dependiente de las magnitudes de su permitividad y conductividad reales, origina el carácter también complejo de

las densidades superficiales de carga, en desfase con el campo aplicado. Como en la ecuación (6.2), la integral es interpretada en el sentido del valor principal de Cauchy. El cálculo analítico de los coeficientes, al igual que en el caso anterior, permite una solución numérica muy precisa, superando la dificultad que representa la gran irregularidad del contorno.

6.2.3. MÉTODO FEM PARA EL POTENCIAL INDUCIDO EN UNA GEOMETRÍA EN 3D

En el estudio realizado sobre partículas tridimensionales se ha recurrido a la técnica de los elementos finitos, FEM, empleando el software ANSOFT (HFSS 1988), dado que no se dispone, hasta el momento, de otro programa que lleve a cabo el mallado superficial de forma eficiente en el caso de geometrías rugosas complejas.

Las ecuaciones de Maxwell se resuelven tras discretizar la geometría considerando elementos tetraédricos. Se han introducido algunas mejoras para el cálculo numérico de la distribución del campo en base a la conocida teoría de elementos finitos, tales como una implementación de las condiciones de contorno, de la región de campo incidente, o los diversos tamaños del mallado según los distintos compartimentos celulares. De hecho, de la misma manera que se hace empleando el método de los elementos de contorno, para poder cubrir la célula de modo óptimo, se ha usado un mallado adaptativo a las dimensiones de las regiones celulares – nanómetros para la membrana y micras para la región citoplasmática– variando el tamaño del tetraedro. Una vez realizado un primer mallado, a través de los resultados obtenidos, se identifican las regiones de mayor intensidad de campo y gradiente de campo, para hacer posteriormente un refinamiento del mallado en las regiones que así lo requieran. Por tanto, para obtener un resultado correcto de la intensidad del campo E inducido en la membrana, el número de tetraedros en esta región ha sido considerablemente mayor –del orden de 28500 unidades– que el empleado para cubrir la región del citoplasma –del orden de 8000–. El valor del campo eléctrico en los puntos dentro de cada tetraedro se obtiene por interpolación a partir de los valores en los vértices del tetraedro. Para lograr una descripción precisa del campo, la región ocupada por cada tetraedro debe ser lo suficientemente pequeña para poder interpolar el campo desde los valores nodales. La precisión de esta técnica está condicionada por el tamaño más pequeño de los elementos de la malla. El dominio computacional se ha limitado estableciendo una región de campo, en la que la célula se encuentra sumergida (medio externo), rodeada por condiciones de contorno absorbentes. Tales condiciones, establecidas según la técnica *Perfectly Matched Layers* o PML (Berenger 1994), consisten en capas absorbentes de espesor finito, perfectamente adaptadas para cualquier onda plana que incide sobre ellas con un ángulo, polarización y frecuencia arbitrarios. La ecuación matricial resultante para los valores del campo en los nodos se resuelve mediante un método iterativo, dando por válida una solución cuando cumple un criterio de convergencia. Para todo el análisis se ha establecido que el error límite de la convergencia ha de ser menor que 10^{-6} .

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los efectos de la rugosidad superficial en una partícula se ha llevado a cabo suponiendo un campo eléctrico aplicado de 1 V/m a 100 kHz, frecuencia a la que la respuesta celular es fuertemente dependiente de las características de la membrana. Tanto en el caso de la rugosidad sinusoidal como en la fractal, las superficies se han caracterizado por los valores cuadráticos medios de anchura y profundidad correspondientes.

6.3.1. MODELO SINUSOIDAL DE LA RUGOSIDAD CELULAR

La primera aproximación al problema consiste en hallar la polarizabilidad de un objeto circular dieléctrico en 2D sometido a un campo eléctrico, y que representa el caso de objetos cilíndricos de gran longitud en un campo aplicado perpendicularmente a su eje. Un primer análisis de la influencia que tiene la rugosidad superficial en una partícula sometida a un campo eléctrico, aparece en la Figura 6.1. El estudio se ha realizado en base al cálculo comparativo de la carga superficial y el potencial inducidos sobre la interfase partícula-medio externo, en los casos de una superficie rugosa y otra lisa. Para ello se ha escogido una partícula sin pérdidas de radio $a = 1 \mu\text{m}$, permitividad $\epsilon_1 = 10\epsilon_0$ en el vacío. Aunque el numero de ondulaciones considerado sea bajo $N_L = 10$ ondulaciones— en la figura 6.1 se ve cómo la densidad de carga inducida κ y el potencial ϕ , en (a) y (b) respectivamente, siguen las variaciones del perfil ondulado a lo largo de los n puntos de la superficie. Para este calculo se ha considerado que la profundidad de la rugosidad, dada por el parámetro h , es veinte veces menor que el radio a . La dependencia que presenta el comportamiento eléctrico de la partícula respecto a la profundidad h de la rugosidad superficial, se ha estudiado a través de su polarizabilidad bajo el campo externo.

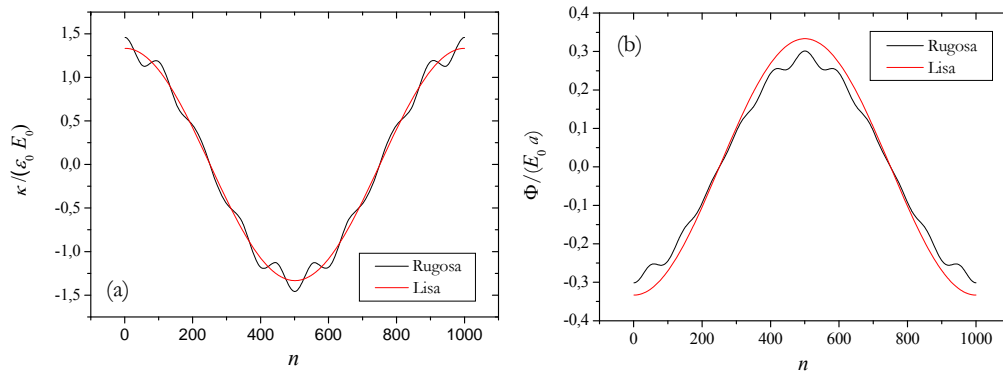


Figura 6.1. (a) Densidad de carga y (b) potencial inducidos a lo largo de n puntos de una superficie lisa o con $N_L = 10$ ondulaciones de una partícula dieléctrica de permitividad $\epsilon_1 = 10\epsilon_0$ sometida a un campo de 1 V/m. La razón fijada entre el radio a de la partícula y la profundidad h de las ondulaciones superficiales es $a/h = 20$.

En la Figura 6.2 se muestra el resultado de la polarizabilidad transversal por unidad de longitud de esta partícula cilíndrica, considerando dos situaciones distintas según el número característico de ondulaciones, N_L , que suponemos sobre su superficie rugosa extendida a lo largo de toda el área cilíndrica.

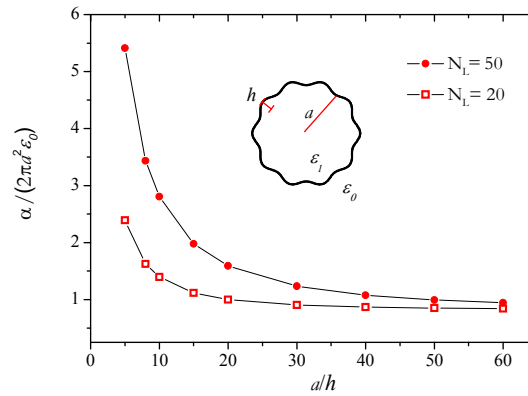


Figura 6.2. Polarizabilidad transversal por unidad de longitud α de un cilindro circular con superficie rugosa sinusoidal en función de a/h . La permitividad del cilindro de radio $a = 1\mu\text{m}$ es $\epsilon_l = 10\epsilon_0$, y N_L el número de ondulaciones de la superficie.

En la misma figura se representa esquemáticamente la partícula con los parámetros implicados en el problema. A partir de las curvas obtenidas se observa cómo, para un determinado grado de rugosidad superficial, la polarizabilidad de la partícula aumenta con la profundidad de las invaginaciones, h . Asimismo, la presencia de un mayor número de irregularidades N_L en la superficie supone también una mayor polarizabilidad de la partícula. Cuando la rugosidad de las partículas se hace muy pequeña, aproximándose a una superficie lisa, su polarizabilidad tiende a igualarse en todos los casos.

El siguiente paso del análisis bidimensional consiste en considerar los efectos de la rugosidad en la superficie de la capa que envuelve a una partícula, ajustando el modelo a la estructura de una célula biológica típica. De este modo, mediante la caracterización de la membrana celular como una superficie rugosa, se realiza una primera aproximación a la envoltura compleja de la célula. El modelo celular empleado para el cálculo sigue siendo la partícula de una micra de radio, rodeada ahora de una capa ondulada –la membrana– de 10 nm de espesor. Todos los resultados de este trabajo se han obtenido empleando valores típicos para las propiedades eléctricas de las regiones implicadas en el problema. En la Tabla 6.1 aparecen los parámetros eléctricos para la membrana no conductora y el medio interno altamente polarizable, así como los del medio externo. La polarizabilidad de una biopartícula rodeada por una membrana, caracterizada por los parámetros anteriores y obtenida en función de la profundidad relativa de la rugosidad, a/h , se muestra en la Figura 6.3

	ϵ/ϵ_0	σ (S/m)
Citoplasma	50	0.5
Membrana ($\delta=10$ nm)	10	10^{-6}
Medio externo	80	$1.5 \cdot 10^{-3}$

Tabla 6.1. Parámetros dieléctricos para los distintos medios intra y extracelulares.

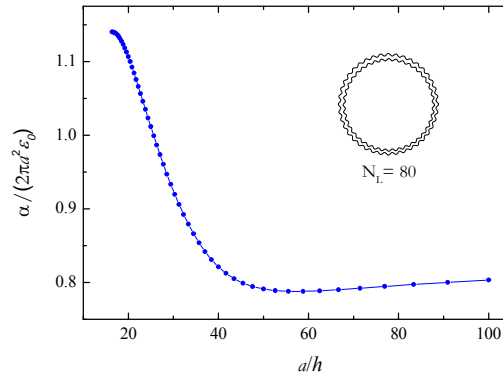


Figura 6.3. Variación de la polarizabilidad por unidad de longitud de una partícula rodeada de una capa sinusoidal en función de la razón a/h ; el número de ondulaciones superficiales es $N_L = 80$.

Del comportamiento resultante mostrado en la curva, cabe señalar una zona de inflexión que presenta la polarizabilidad de la partícula cuando la razón a/h alcanza un valor intermedio en el rango de valores considerados. Es probable que dicho comportamiento sea debido a la correlación entre las cargas inducidas sobre pliegues contiguos.

6.3.2. MODELO FRACTAL DE LA RUGOSIDAD CELULAR

La siguiente aproximación a la superficie celular se ha realizado mediante la geometría fractal. La topografía de una superficie fractal para el modelo de la célula se ha generado empleando una versión modificada de la función Weierstrass-Mandelbrot cuya expresión para el perfil rugoso $f(r)$ viene dada por (Yan y Komvopoulos 1998)

$$f(r) = \sum_{n=-n_{\max}}^{n_{\max}} b^{-n(2-D)} \left[1 - k \cos(b^n r + \varphi) \right] \quad (6.5)$$

donde b es un factor multiplicativo –con un valor típico entre 1.1 y 3–, φ es una fase generada aleatoriamente, D es la dimensión fractal –con valores entre 1 y 2– y k es un factor de forma usado para modificar el perfil.

La respuesta dieléctrica de una célula con superficie fractal ha sido analizada mediante el BEM para la carga inducida sobre su superficie. El resultado promediado de la polarizabilidad

obtenida para cinco fases φ aleatorias diferentes y una topografía típica de membrana, se muestra en la Figura 6.4. La variable b es el valor medio de la profundidad de la rugosidad.

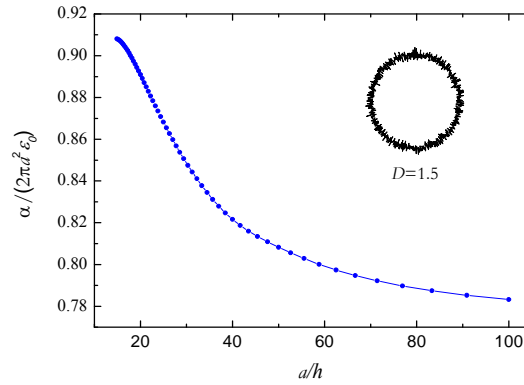


Figura 6.4. Variación de la polarizabilidad por unidad de longitud como función de a/b realizado para una partícula rodeada de una membrana generada por fractales y caracterizada por una dimensión fractal $D = 1.5$, y un factor de forma $k = 1.9$

Al igual que en el caso de la topografía sinusoidal, la presencia de la capa rugosa determina una tendencia creciente de la polarizabilidad a medida que la profundidad de los pliegues se acentúa. En cambio, ahora la aleatoriedad de la superficie fractal atenúa los posibles efectos de correlación entre las cargas, proporcionando un crecimiento monótono de la polarizabilidad respecto a la rugosidad superficial.

6.3.3. MODELOS TRIDIMENSIONALES

Un paso más en el estudio de la rugosidad superficial de las células se ha realizado considerando modelos en 3D. A partir de estos, se ha querido obtener un mejor conocimiento del estado fisiológico de las partículas biológicas bajo experimentación electrocinética, evaluando para ello los cambios inducidos en el potencial transmembrana. Se ha considerado una célula esférica con una capa de morfología rugosa –manteniendo las dimensiones previamente consideradas del radio de $1 \mu\text{m}$ y el espesor de la membrana de 10 nm – que separa el medio interno celular o citoplasma del medio externo en el que se supone suspendida la célula. Cada una de las distintas regiones del problema se caracterizan por los parámetros dieléctricos de la Tabla 6.1. Como se ha realizado con anterioridad, se consideran distintos números de protuberancias – $N_L = 20, 30$ y 40 – a lo largo de la superficie celular. La geometría del modelo en 3D de la célula sobre la que se ha efectuado el estudio aparece representada en la Figura 6.5 (a). Como se observa, este modelo geométrico resulta muy adecuado para el análisis del comportamiento de los equinocitos, cuya imagen microscópica se muestra la Figura 6.5 (b). El equinocito es una forma alterada del glóbulo rojo que puede detectarse en la sangre de individuos con insuficiencia renal, anemia y deshidrataciones graves, o bien en las muestras sanguíneas normales por cambio de pH, o bajas temperaturas.

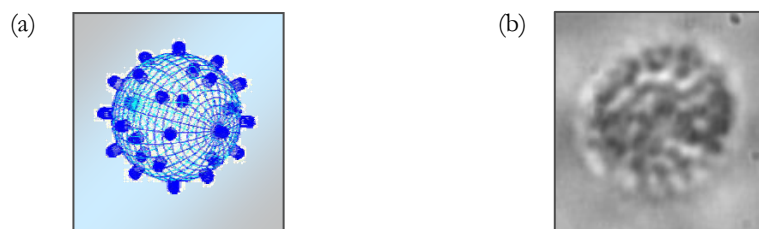


Figura 6.5 (a) Modelo en 3D de una célula con rugosidad en su superficie; (b) Fotografía microscópica (100x), de un glóbulo rojo de geometría esférica con espículas repartidas a lo largo de su membrana.

Los resultados obtenidos para el potencial promedio inducido sobre los diferentes modelos tridimensionales están recogidos en la Tabla 6.2. El valor más alto del potencial eléctrico inducido se ha obtenido para el modelo de superficie lisa ($N_L = 0$), de acuerdo con el resultado previo del estudio bidimensional mostrado en la figura 6.2, donde se comparaba el potencial de una partícula con superficie lisa y otra rugosa. Este resultado podría ser considerado para futuros estudios sobre la estabilidad de los equinocitos sometidos a un campo electromagnético en base al valor mínimo de la energía total –elástica más electromagnética– de su membrana, mediante cálculos análogos a los planteados en el estudio de los eritrocitos, reseñado en el capítulo 5.

N_L	PTM (nV)
0	60
20	28
30	24
40	20

Tabla 6.2. Potencial transmembrana promedio, PTM, inducido sobre una célula con un total de N_L protuberancias localizadas a lo largo de la superficie celular. El cálculo se realiza para el modelo 3D, aplicando un campo eléctrico de intensidad de 1 V/m.

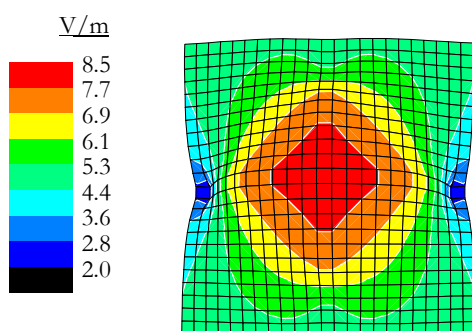


Figura 6.6. Campo eléctrico inducido sobre una espícula del modelo tridimensional correspondiente a un equinocito con $N_L = 64$. El campo externo, que se aplica en dirección normal a la espícula en su punto más alto, tiene una intensidad de 1 V/m.

Finalmente se presenta el campo eléctrico inducido sobre una de estas espículas y su entorno, en el caso de un equinocito que presenta $N_L = 64$ protuberancias en su superficie. La espícula analizada está situada en el punto más alto de la geometría modelada, siendo por ello sobre la que se induce el máximo de campo cuando este se aplica normalmente a ésta. Como puede observarse en la Figura 6.6, el campo inducido es máximo en el extremo superior de la espícula, disminuyendo su valor de manera progresiva a medida que nos acercamos a la superficie lisa de la célula, de acuerdo con los valores obtenidos para el potencial inducido.

6.3.4. APLICACIÓN DEL MODELO FRACTAL PARA EL ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS

Con la introducción de la dimensión fractal para el estudio de la interacción del campo eléctrico con células de superficies rugosas, se han analizado nuevamente los resultados presentados en el capítulo anterior, referentes a la agregación de linfocitos-T. Conocida la rugosidad de las células T-Jurkat, allí se contrastaron los resultados experimentales y la estimación teórica de la frecuencia de cruce f_{∞} tras la introducción del parámetro topográfico Φ , que suponía únicamente un aumento de la capacidad de la membrana debido a su mayor extensión. A través de f_{∞} se pretende realizar la caracterización de la membrana celular para, finalmente, poder inducir a partir de ésta la información relativa a los cambios fisiológicos que puedan darse, como consecuencia de los eventos de señalización transmembrana asociados a la activación de esta célula del sistema inmunitario.

Hasta este punto se ha visto cómo la rugosidad de una partícula bajo un campo eléctrico implica una mayor polarizabilidad inducida en la misma. Este mismo resultado se obtuvo en el análisis realizado con el factor topográfico. Pero este modelo fallaba al predecir las frecuencias f_{∞} de las partículas encadenadas, ya que sobreestimaba el desplazamiento de la frecuencia a medida que el número de partículas agregadas aumentaba.

Al introducir la geometría fractal en el modelo de una partícula dieléctrica, hemos adoptado la expresión que Bordi (Bordi *et al* 1993) propuso para la admitancia superficial Y , de modo que el comportamiento eléctrico de la membrana celular se describe, no sólo por los parámetros permitividad ε y conductividad σ , hasta ahora empleados, sino también por otros que incluyen además las propiedades de la geometría fractal de la capa que rodea a la partícula. La expresión de la admitancia viene dada por

$$Y = m y^\beta \quad (6.6)$$

donde $y = G + i\omega C$ es la admitancia por unidad real de superficie y m es un factor que depende de la geometría de la partícula y de la conductividad del medio en el que se encuentra suspendida. C y G son la capacitancia y conductancia por unidad de área, cuyas expresiones, para el caso de la membrana, son

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_m / \delta \quad (6.7)$$

$$G = \sigma_m / \delta \quad (6.8)$$

con δ el espesor de la membrana. El parámetro β , según el modelo de Bordi, da una medida de la irregularidad de la superficie por medio de la dimensión fractal D , según la relación

$$\beta = 1/(D-1) \quad (6.9)$$

De este modo, una superficie rugosa tiene un comportamiento intermedio entre una superficie lisa ($\beta = 1$, $D = 2$) y otra porosa ($\beta = 1/2$, $D = 3$). Adoptados estos parámetros y considerando la membrana fractal de un espesor aparente δ_0 , la permitividad equivalente de esta capa está ahora dada por

$$\tilde{\varepsilon}(\omega) = \delta_0 \left\{ m \left(\frac{\varepsilon_m}{\delta} - i \frac{\sigma_m}{\omega \delta} \right) \right\} \quad (6.10)$$

Dado que las características fractales sólo se encuentran en la membrana citoplasmática de los linfocitos, y que en el rango de frecuencias bajo estudio la respuesta de la célula depende fuertemente de las propiedades de la membrana, en el modelo hemos obviado la presencia del núcleo y de la membrana que lo rodea. Llevando la expresión (6.10) al modelo del linfocito-T, se han calculado las frecuencias de cruce correspondientes a cada una de las formaciones lineales, tomando los parámetros dieléctricos que se emplearon en el capítulo anterior, y variando los parámetros fractales hasta ajustar los valores experimentales. Los resultados se muestran en la Figura 6.7 donde, suponiendo el radio medio experimental de cada formación celular —que varía entre 3.4 y 3.5 μm — los parámetros que describen la geometría fractal de las células han tomado los valores $D = 2.32$, con lo que $\beta = 0.75$, y $\delta_0 = 0.2 \mu\text{m}$.

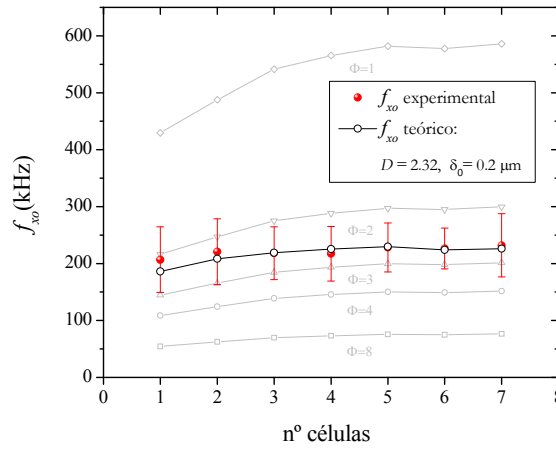


Figura 6.7. Frecuencias de cruce f_{xo} para las cadenas celulares de linfocitos-T obtenidas según el modelo fractal para la membrana de espesor aparente $\delta_0 = 0.2 \mu\text{m}$ y dimensión fractal $D = 2.32$. Sombreadas aparecen los valores obtenidos para las f_{xo} de acuerdo con el parámetro topográfico introducido en el capítulo 5.

La dimensión D es de un valor muy próximo al de $D = 2.30$, deducido por Bordi a través del análisis fractal de los datos extraídos de las medidas de impedancia de suspensiones de linfocitos, en base a la teoría de Maxwell-Wagner para una partícula de una sola capa. Según las indicaciones de su modelo, el valor de β correspondería a una rugosidad media de la partícula. El espesor aparente δ_0 —que da una idea de la extensión de las protusiones en la membrana— representa un 5.8% del valor del radio celular, frente al 0.1% que representa el espesor real de la membrana $\delta = 4.5$ nm.

Como puede observarse en dicha figura, conforme a los parámetros del modelo fractal, las frecuencias de cruce estimadas están más cerca de los valores experimentales observados, si bien tal acuerdo es mayor justamente para los casos de formaciones de más de 3 células. En la gráfica se muestran al mismo tiempo los resultados de las frecuencias de cruce obtenidas en el capítulo anterior tras la introducción del parámetro topográfico, como medio de cuantificación del aumento de la capacidad de la membrana debido a la presencia de pliegues. A través de éstos, la rugosidad de los linfocitos se evaluó por medio de un factor topográfico $\Phi=2.2$, acorde con el valor referenciado en la literatura (Pethig *et al* 2002), que sin embargo era aceptable únicamente para extraer las frecuencias de cruce de la partícula aislada y losdobletes. En cambio, una vez introducida la rugosidad de la membrana en el modelo de la célula, las frecuencias f_{ω} obtenidas muestran un muy buen acuerdo con los resultados observados experimentalmente. Este hecho demuestra la conveniencia de incluir una descripción más realista de la membrana celular, insuficientemente considerada a través del parámetro topográfico de la superficie, sobre todo para el análisis de la interacción membrana-membrana que se produce en los efectos de encadenamiento o *pearl-chaining*.

6.4. CONCLUSIONES

En este estudio preliminar de la influencia de la inhomogeneidad de las superficies en la respuesta al campo de las partículas dieléctricas, se ha visto la importancia de la inclusión de tales características en el modelo de la célula. Las dos aproximaciones al problema —superficies de geometría sinusoidal y fractal— han proporcionado una idea clara de la mayor polarizabilidad que posee una partícula rugosa respecto a otra lisa.

El primer contacto con el problema a través de la rugosidad vista en el corte transversal de una corteza cilíndrica dieléctrica, tanto en el caso de la respuesta eléctrica obtenida mediante el potencial como en la obtenida en base a la carga inducida en las interfases, proporcionaba un perfil siguiendo la topografía de la superficie. Como consecuencia de la rugosidad superficial se ha visto que la polarizabilidad es, en general, potenciada tanto por la profundidad de los pliegues como por el número de ellos. A continuación, el problema en 2D consideraba la partícula rodeada de una capa caracterizada por las dos aproximaciones matemáticas introducidas. Se ha visto que la tendencia del comportamiento eléctrico encontrada según los análisis sinusoidal y fractal es similar, excepto en la región de rugosidad intermedia, donde la polarizabilidad de la partícula con protusiones sinusoidales es menor debido probablemente a las correlaciones en las cargas inducidas en ondulaciones próximas.

Completando el problema al tratar el modelo de la célula rugosa en 3D, ha podido analizarse el comportamiento eléctrico de un equinocito a través del cálculo del potencial transmembrana y del campo eléctrico inducido por el campo externo alrededor de una las espículas de su superficie. Los resultados muestran la tendencia ya marcada por los estudios en 2D, con un TMP que disminuye al aumentar el número de protuberancias en la superficie, y un campo eléctrico inducido que es máximo en los extremos de tales protuberancias. Este estudio puede aportar nuevas posibilidades en el conocimiento de las propiedades físicas de la membrana cuando se observan los cambios conformacionales de los glóbulos rojos en diversas condiciones patológicas o simplemente en los estados de agregación celular. Además, podría explicar el elevado valor de la capacidad específica de la membrana celular observada por electrorotación en determinadas células con morfologías complejas, y que es mayor que el valor típico de 10 mF/m^2 .

Finalmente, hemos aplicado la descripción fractal para estimar por medio de la frecuencia de cruce las propiedades dieléctricas de la membrana, cuando los linfocitos interaccionan formando cadenas durante la experimentación dielectroforética. Mediante la geometría fractal hemos conseguido caracterizar la complejidad de la membrana, estimando su dimensión fractal y su espesor aparente. Por otra parte, la inclusión del modelo en el estudio de las frecuencias de cruce en agregados de linfocitos ha permitido mejorar la estimación del desplazamiento observado de dicha frecuencia, respecto al estudio realizado previamente en el que se consideró una mayor capacidad de la membrana por medio de un factor topográfico. Esto demuestra la importancia que tiene incluir las características morfológicas de la membrana en el modelo empleado para su caracterización, más aún cuando a partir de ésta se pretende indagar en la fisiología o estado de la célula.

Aunque el estudio requiera posteriores avances, los resultados obtenidos muestran que el método desarrollado es válido para incluir la descripción fractal de las superficies en los modelos celulares, y ayudar así a profundizar en el estudio estructural de la membrana y de sus posibles transformaciones, muchas veces ligadas con estados patológicos.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- Berenger JP (1994). *A Perfectly Matched Layer for the Absorption of Electromagnetic-Waves*. Journal of Computational Physics 114(2): 185-200.
- Bordi F, Cametti C y Dibiasio A (1990). Determination of Cell-Membrane Passive Electrical-Properties Using Frequency-Domain Dielectric-Spectroscopy Technique - a New Approach. Biochimica Et Biophysica Acta 1028(2): 201-204.
- Bordi F, Cametti C, Rosi A y Calcabrini A (1993). Frequency-Domain Electrical-Conductivity Measurements of the Passive Electrical-Properties of Human-Lymphocytes. Biochimica Et Biophysica Acta 1153(1): 77-88.
- Bordi F, Cametti C y Gili T (2002). Dielectric Spectroscopy of Erythrocyte Cell Suspensions. A Comparison between Looyenga and Maxwell-Wagner-Hanai Effective Medium Theory Formulations. Journal of Non-Crystalline Solids 305(1-3): 278-284.
- Caron J, Lafait J y Andraud C (2002). Scalar Kirchhoff's Model for Light Scattering from Dielectric Random Rough Surfaces. Optics Communications 207(1-6): 17-28.
- Cross SS (1997). *Fractals in Pathology*. Journal of Pathology 182(1): 1-8.
- Heymans O, Fissette J, Vico P, Blacher S, Masset D y Brouers F (2000). *Is Fractal Geometry Useful in Medicine and Biomedical Sciences?*. Medical Hypotheses 54(3): 360-366.
- Losa GA, Baumann G y Nonnenmacher TF (1992). Fractal Dimension of Pericellular Membranes in Human Lymphocytes and Lymphoblastic Leukemia Cells. Pathol Res Pract 188(4-5): 680-6.
- Mandelbrot BB (1982). *The Fractal Geometry of Nature*. Ed. Freeman, San Francisco.
- Pethig R, Bressler V, Carswell-Crumpton C, Chen Y, Foster-Haje L, Garcia-Ojeda ME, Lee RS, Lock GM, Talary MS y Tate KM (2002). *Dielectrophoretic Studies of the Activation of Human T Lymphocytes Using a Newly Developed Cell Profiling System*. Electrophoresis 23(13): 2057-2063.
- Yan W y Komvopoulos K (1998). *Contact Analysis of Elastic-Plastic Fractal Surfaces*. Journal of Applied Physics 84(7): 3617-3624.

CONCLUSIONS AND CONTRIBUTIONS

This thesis sets out a numerical technique that allows defining and solving dielectric models for DEP experiments for biomedical purposes. The method developed is suitable for any geometrical shape and structure of biological cells, in contrast to the usual models, which rely on spherical geometries or on existing symmetries that allow the use of simplified analytical techniques.

We also present the results obtained from several dielectrophoretic experiments that have been analysed through the proposed numerical method, in an attempt to provide a better understanding of the relationship between the dielectric behaviour and the physiological state of biological cells undergoing dielectrophoresis.

The reliability of the method was established in the early stages of its development, and therefore it was applied to the cases of interest. The dielectrophoretic behaviour of a variety of bioparticles – bacteria and blood cells in both healthy/active/viable or sickly/non active/non viable states– has been studied overcoming some limitations characteristic of the analytical solutions of the problem.

The modified Boundary Element Method (BEM) technique that we have used provides, besides the superficial induced charge over the particle, a direct computation of other magnitudes of interest such as, for example, the equivalent polarizability of the particle and the induced transmembrane potential.

The proposed BE method does not require great computational resources, since only the surfaces are discretized, which is done without any polynomial approximation. This is in sharp contrast with the resources required for the dense grids of the whole volume in traditional finite difference (FDM) or finite element methods (FEM).

As a first application of the BE method, we have considered the numerical design of electrodes in order to simulate the best conditions for the experimental devices to collect particles under the dielectrophoretic effect. The possibility of studying different electrode configurations under mixed

boundary conditions, as well as the incorporation into the analysis of characteristics such as the height of the chamber, the thickness of the electrodes and their dielectric coating, has shown the versatility of our method. Consequently, very useful information is presented about the field and DEP forces created by the microelectrode chamber that we have designed and used. These first results provide an appropriate ground for the experiments that followed.

The evaluation of the dielectrophoretic processes with the aid of our model allows for a more accurate characterization of biological cells, since it incorporates a better modelization of the complex morphology of the real cells. This characterization is performed without paying a high cost on computational resources, and with the only restriction that modeled shapes must be axisymmetric.

We have shown the potential of dielectrophoresis for detecting differences between the two species into which bacteria are usually classified: gram-positive and gram-negative bacteria. The different cellular compartments of *Staph. aureus* and *E. coli*—as gram-positive and negative bacteria respectively—have been dielectrically characterized; moreover, the relations with some of their physiological properties, such as the ionic content of the cytoplasm or the pathogenicity of the species, have been obtained.

Dielectrophoresis can become a complementary technique to the gram staining method, which is commonly used to differentiate between the types of bacteria on the basis of their cell wall morphology. Gram identification—that assists in the reduction of world-wide antibiotic resistance—is a time consuming task, and often some bacteria of medical importance do not stain effectively. An improved and automated methodology based on the dielectrophoretic characterization for gram classification could aid in improving laboratory diagnosis.

The potential applications of dielectrophoretic techniques in the microbiological domain also extend to the action of antibiotics. One of the main objectives of our studies in this area was the development of a rapid antibiotic susceptibility test using dielectrophoresis. Despite the fact that we couldn't achieve this goal so far—the experimental conditions were not appropriate for the antibiotic to properly exert its action over the bacteria—it has been possible to extract some information about the behaviour of *E. coli* suspended in aqueous solution with several doses of ampicillin. The dielectric model has provided interesting results supported by physiological characteristics of the bacteria. This study opens the way for further research on the feasibility of antibiotic susceptibility testing based on DEP.

Our method could also mean an important advance since it also allows modelling interactions effects between cells that take into account the influence of their shapes; this is an improvement over the usual theoretical treatments, based on dipole-dipole interactions, without considering multipolar effects, and therefore underestimating the interaction forces between particles when they come closer.

Next, we focus our attention on the study of the rouleau formation under an electric field of 1.8 GHz—one of the carrier frequencies employed in mobile phone devices, from an energetic point of view. We must point out that, under normal conditions of exposure to the electromagnetic field, the

aggregation effects are negligible and, therefore, no cell damage is detected because of increased forces between them. Only in unusual cases of great field intensities could the electrical energy involve some risk.

Turning now to the lymphocyte pearl-chaining effect, the theoretical estimation of changes on the characteristic crossover frequency caused by the chain formation shows a good agreement with experimental results, providing useful information for protocol processes of separation of particles based on DEP. However, the final goal of this study –the differentiation between active and non-active lymphocytes, that is, between lymphocytes ready to exert their immunological function and those who are not– needs further work.

One aspect in the improvement of the analysis of the pearl-chaining effect is the consideration of the morphological properties of the external membrane, often presenting folds, and not considered in previous works on the subject. Taking into account two surface models for the cells –sinusoidal approach and fractal geometry– our method has been extended to get further insight into the influence of surface morphology on relevant electrical parameters and on the process of the formation of pearl-chains when particles come closer.

It turns out that both the potential and the induced charge experience changes following the surface topography, and the polarizability is, in general, markedly enhanced as the roughness height increases. The trends for sinusoidal and fractal topography are similar, except in the region of intermediate roughness height, where the polarizability for the sinusoidal case is lower, probably due to correlations in the induced charges on neighbouring undulations.

Using a 3D model for an echinocyte –an altered shape of erythrocyte– we have studied the influence of the spicules on the induced transmembrane potential, and analyzed the electric field induced over one of these needle-like structures. The results shows that, on the one hand, the induced TMP decreases for a growing number of protuberances, and, on the other hand, the induced field gradually rises from the flat cell surface to the top of the spicule, reaching a maximum there.

These studies could explain the high specific capacitance of cells with complex surface morphology derived from electrorotation (ER) data, greater than the typical cell membrane value of 10 mF/m^2 . Even when this is an initial treatment of the roughness problem, it represents a step into the comprehension of the electrical behaviour of erythrocyte pathological shapes, or the changes in the membrane morphology associated to activation in immunological cells.

Incorporating the fractal geometry in our cell model for the lymphocytes, the calculated crossover frequencies for the chains formed are closer to the experimental results. In this way, the developed method is potentially useful for gaining a deeper comprehension of the structural and dielectric behaviour of the membrane, usually related to pathologic or abnormal states of the cells.

Finally, we propose to extend the application of dielectrophoretic techniques to the antibiotic assessment in collaboration with microbiologists in this field. The DEP characterization of lymphocyte membranes in active state is also one of the open research lines, with interesting biomedical

implications in the fight against the VIH or other immunological diseases. In addition, a further comprehension of biological membranes is pursuit through a mixed technique combining the dielectrophoresis with optical tweezers, in an initiated collaboration with the University of Medicine Carol Davila of Bucharest. The planned work consists in the study of electrodeformation by DEP forces of cells trapped in a laser beam projected perpendicularly to the electrode plane. Thus, interpreting this effect with a convenient model, we could extract relevant information about membrane fluidity and hence, get a better knowledge about its relationship with the physiological state of the cells.

